UNIVERSITE DE LAUSANNE - FACULTE DES SCIENCES
ET
INSTITUT SUISSE DE RECHERCHES EXPERIMENTALES SUR LE CANCER

DIE POLYPEPTIDE DES HÜHNER-LEUKOSE-VIRUS

(AVIAN MYELOBLASTOSIS VIRUS)

1. TRYPTISCHE PEPTIDMUSTER DER GRUPPENSPEZIFISCHEN POLYPEPTIDE
2. VERSUCHE **IN VITRO** ZUR SPALTUNG VON VIRALEN VORLÄUFER-POLYPEPTIDEN IN GRUPPENSPEZIFISCHE VIRION-POLYPEPTIDE

Thèse de Doctorat
présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne

par ROBERT BRASCHLER
diplômé de l'Université de Zurich en biologie moléculaire

Clausthal-Zellerfeld
Bönecke-Druck
1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546809_0022

UNIVERSITE DE LAUSANNE - FACULTE DES SCIENCES
ET
INSTITUT SUISSE DE RECHERCHES EXPERIMENTALES SUR LE CANCER

DIE POLYPEPTIDE DES HÜHNER-LEUKOSE-VIRUS

(AVIAN MYELOBLASTOSIS VIRUS)

1. TRYPTISCHE PEPTIDMUSTER DER GRUPPENSPEZIFISCHEN POLYPEPTIDE
2. VERSUCHE **IN VITRO** ZUR SPALTUNG VON VIRALEN VORLÄUFER-POLYPEPTIDEN IN GRUPPENSPEZIFISCHE VIRION-POLYPEPTIDE

Thèse de Doctorat
présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne

par ROBERT BRASCHLER
diplômé de l'Université de Zurich en biologie moléculaire

Clausthal-Zellerfeld
Bönecke-Druck
1975

Imprimatur

Université de Lausanne
Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

MM Prof. Bernhard HIRT, directeur de thèse, Mme Dr. Heidi DIGGELMANN expert, et Prof. Georges BRUNISHOLZ, président du jury

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

M. Robert BRASCHLER, diplômé en biologie moléculaire, Université de Zurich

intitulée "Die Polypeptide des Hühner - Leukose - Virus (Avian Myeloblastosis Virus)"

Lausanne, le 7 juillet 1975

pour *Le doyen de la Faculté des Sciences:*
Prof. Georges BRUNIHOLZ, vice-doyen

UNIV. LEIDEN BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde am Schweizerischen Institut für experimentelle Krebsforschung durchgeführt (Direktor: Prof. Dr. H. Isliker). Herrn Prof. Isliker danke ich für die Aufnahme am Institut.

Meinen besonderen Dank spreche ich Frau Dr. H. Diggelmann aus. Sie übernahm die Leitung der vorliegenden Arbeit und führte mich in den Problemkreis der RNS-Tumorvirus-Forschung ein.

Herrn Prof. B. Hirt danke ich für die wohlwollende Förderung der Arbeit und für seine Bereitschaft, die vorliegende Dissertation vor der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Lausanne zu vertreten.

Den Mitarbeitern des Departements Virologie danke ich für die Mithilfe am Zustandekommen der vorliegenden Arbeit.

Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Meinen herzlichen Dank spreche ich auch meiner Frau Brigitte und meinen Eltern aus.

Abkürzungen

A (mA)	Ampere (Milliampere)
AMV	Hühner-Leukose-Virus (Avian Myeloblastosis Virus)
^{14}C-Arg	^{14}C-Arginin
^{3}H-Arg	^{3}H-Arginin
C (µC)	Curie (Mikrocurie)
^{o}C	Temperatur in Celsius-Grad
DEAE-Zellulose	Diäthylaminoäthyl-Zellulose
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DNS	Deoxyribonukleinsäure
DOC	Natrium-Deoxycholat
EDTA	Aethylendiamintetraazetat (Titriplex III)
gs-Proteine	gruppenspezifische Virion-Proteine
^{3}H-Met	^{3}H-Methionin
^{35}S-Met	^{35}S-Methionin
ml (µl)	Milliliter (Mikroliter = 10^{-3} Milliliter)
NP-40	Nonidet-P 40
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-Puffer
PI	Pentamidin-Isäthiomat
PP	Virales Vorläufer-Polypeptid
RNS	Ribonukleinsäure
RSB	Retikulozyten-Standard-Puffer
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPM	Umdrehungen pro Minute
VP	gs-Virion-Polypeptid

Seite

Abkürzungen

I. Einleitung 1

II. Material und Methoden 3

1. Material/Reagenzien, Lieferant, Abkürzung, Literatur 3

2. Methoden 7

2.1. Herstellen von Hühner-Fibroblasten-Kulturen 7

2.2. *In vivo* Markierung von Virus-Proteinen 8

2.3. Reinigung der Virus-Partikel 8

2.4. Aufbrechen der Virus-Partikel 9

2.5. Auftrennung der gruppenspezifischen Virion-Proteine 9

2.5.1. Auftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese 10

2.5.2. Auftrennung durch Agarose-Gelfiltration 12

2.6. Tryptische Spaltung der Polypeptide 12

2.7. Auftrennung der Peptide 13

2.7.1. Zweidimensionale Auftrennung der Peptide durch Elektrophorese und Chromatographie 13

2.7.2. Auftrennung der Peptide durch "Chromobead-P" Ionenaustauscher-Säule 14

2.8. Immunpräzipitation der Virus-Antigene 15

2.9. Herstellen von Zell-Lysaten 16

III. Tryptische Peptidmuster der gruppenspezifischen Virion-Proteine von Hühner-Leukose-Viren (Avian Myeloblastosis Virus) 18

3. Problemstellung 18

4. Resultate 20

4.1. Peptidmuster nach zweidimensionaler Auftrennung der Peptide durch Elektrophorese und Chromatographie 20

4.1.1. ^{35}S-Methionin markierte Virion-Peptide 20

4.1.2. ^{14}C-Arginin markierte Virion-Peptide 25

4.2. Peptidmuster nach Auftrennung der Peptide durch "Chromobead-P" Ionenaustauscher-Säule 29

4.2.1. ^{3}H-Arginin markierte Virion-Peptide (Nach Auftrennung der Polypeptide durch Agarose-Gelfiltration) 29

4.2.2. ^{14}C-Arginin/^{3}H-Arginin markierte Virion-Peptide (Nach Auftrennung der Polypeptide durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) 32

4.2.3. Quantitative Arginin-Bestimmung durch "Chromo-bead-P" Ionenaustauscher-Säule 34
5. Diskussion 36
6. Zusammenfassung - Résumé - Summary 39
IV. Versuche in vitro zur Spaltung von Hühner-Leukose-Virus Vorläufer-Proteinen in gruppenspezifische Virion-Proteine 43
7. Problemstellung 43
8. Isolierung von viralen Vorläufer-Polypeptiden 44
8.1. Versuche zur Anreicherung von viralen Vorläufer-Polypeptiden in virusinfizierten Zellkulturen 44
8.1.1. Behandlung der virusinfizierten Zellkulturen mit Diisopropylfluorophosphat 44
8.1.2. Behandlung der virusinfizierten Zellkulturen mit Pentamidin-Isäthiomat 45
8.2. Isolierung der viralen Vorläufer-Polypeptide aus dem Lysat von virusinfizierten Zellen 45
8.2.1. Fraktionierung des Zellhomogenats durch einen exponentiellen Saccharose-Gradienten 45
8.2.2. Ammoniumsulfat-Präzipitation des Lysats von virusinfizierten Zellen 48
8.2.3. DEAE-52 Säulenchromatographie des Lysats von virusinfizierten Zellen. 51
8.2.4. Sephadex - G 100 Säulenchromatographie des dissoziierten Immunkomplexes 52
8.2.5. Immunadsorption der viralen Antigene auf BrCN-aktivierter Sepharose 4B 54
8.2.6. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der immunpräzipitierten Virus-Antigene 55
8.2.7. Fraktionierung der Zytoplasma-Membranen aus dem Homogenat von virusinfizierten Zellen 56
9. Optimierung der Spaltungsbedingungen der viralen Vorläufer-Proteine im ultrabeschallten Zell-Lysat 59
10. Versuche in vitro zur Spaltung von isolierten viralen Vorläufer-Polypeptiden in gruppenspezifische Virion-Polypeptide 66
10.1. Versuche in vitro zur Spaltung der immunpräzipitierten viralen Vorläufer-Polypeptide (Antigen-Antikörper-Komplex) 66

10.2. Versuche *in vitro* zur Spaltung der aus dem SDS-Gel eluierten viralen Vorläufer-Polypeptide 66
10.3. Versuche *in vitro* zur Spaltung der an Zellmembranen gebundenen viralen Vorläufer-Polypeptide 71
11. Studien zur Beziehung zwischen viralen Vorläufer-Polypeptiden und der Zellmembranen 77
12. Diskussion 84
13. Zusammenfassung - Résumé - Summary 88
V. Literatur 90

I. Einleitung

Oncorna- oder RNS-Tumor-Viren können Säugetiere, Vögel oder Reptilien infizieren. Sie werden in 2 Gruppen unterteilt; in die Gruppe der Leukose-Viren und in die Gruppe der Sarkomatose-Viren. Die mit Hühner-Leukose-Virus infizierten Hühner-Fibroblasten-Kulturen produzieren Virionen, die aus dem Medium isoliert und gereinigt werden können. Die aus den Wirts-Zellen ins Medium austretenden Virus-Partikel zerstören die Zellstruktur nicht. Hühner, die mit Leukose-Virus infiziert wurden, erkranken an myeloischer Leukämie und Lymphomatose. Infektiöse Virionen können aus dem Blutplasma der erkrankten Tiere isoliert und gereinigt werden. Hühner-Sarkomatose-Viren transformieren die Fibroblasten-Zellkulturen. Nach Injektion des Virus in Hühner erkranken die Tiere an Myxosarkomatose. Eine erhöhte Ausscheidung von Hyalurinsäure kann dabei nachgewiesen werden. Einige der RNS-Tumor-Viren scheinen die Ursache für natürlich vorkommende Tumoren zu sein (Tooze 1973). Die Oncorna-Viren bestehen aus einsträngiger Ribonukleinsäure (RNS), einer lipidenthaltenden Umhüllung, 6 oder 7 Haupt-Proteinen und einigen Proteinen, die in geringeren Mengen nachgewiesen werden konnten. Die Hauptproteine der Hühner-Tumor-Viren werden entsprechend ihrer antigenen Eigenschaften in 2 Gruppen unterteilt; in die Proteine mit gruppenspezifischer Antigenität und in die Proteine mit typenspezifischer Antigenität. Aus den gereinigten Virionen wurden 4 gruppenspezifische, immunologisch unterscheidbare Proteine isoliert (Fleissner 1971). Jene gruppenspezifischen (gs) Proteine der Hühner-Leukose- und Sarkomatose-Viren, die ähnliche elektrophoretische Mobilitäten aufweisen, unterscheiden sich immunologisch nicht voneinander (Huebner 1964). Die gs-Proteine sind innerhalb der Lipidumhüllung lokalisiert (Fleissner 1971, Rifkin 1971, Davis 1972). Ein gs-Protein konnte in Verbindung mit der viralen RNS nachgewiesen werden (Quigley 1972, Fleissner und Tress 1973, Bolognesi 1973).

Die 2 typenspezifischen Proteine bilden Fortsätze auf der Oberfläche des Virions (Rifkin 1971) und binden die neutralisierenden Antikörper (Ishizaki 1966, Chubb 1968). Die typenspezifischen Proteine der verschiedenen Virusuntergruppen (Ishizaki 1966, Duff 1969, Duesberg 1970) und der verschiedenen Virusisolationen der gleichen Untergruppe (Vogt P.K. 1969) unterscheiden sich in ihrer Antigenität voneinander. An die typen-

spezifischen Proteine sind, im Gegensatz zu gs-Proteinen, Kohlenwasserstoffe gebunden (Duesberg 1970, Krantz 1974).

Die gruppen- und typenspezifischen Proteine und ein niedermolekulares Protein, dessen antigene Eigenschaft unbekannt ist (Fleissner 1971), bilden die Strukturproteine bei Hühner-Tumor-Viren. Zumindest eines der in geringen Mengen nachgewiesenen Proteine, die RNS-abhängige DNS-Polymerase, wird in das infektiöse Oncorna-Virion eingebaut (Temin 1970, Baltimore 1970, Hanafusa H. 1972, Linial 1973, Verma 1974).

Die Proteine einer Anzahl tierischer Viren werden vorerst als hochmolekulare Vorläufer-Proteine synthetisiert und anschliessend durch proteolytische Enzyme in Virion-Proteine gespalten. Eine solche Spaltung wurde erstmals beim Poliovirus und beim Enzephalomyokarditis-Virus, zwei Vertretern der Picornavirus-Klasse, nachgewiesen (Jacobson 1970, Butterworth 1972). In den virusinfizierten Zellen wird eine Polypeptidkette von 200'000 - 300'000 Dalton Molekulargewicht entlang der gesamten viralen RNS synthetisiert und anschliessend stufenweise proteolytisch gespalten. Die Teilstücke bilden die Strukturproteine der Virionen und weitere virusspezifische Proteine. Eine Spaltung von hochmolekularen viralen Vorläufer-Proteinen konnte auch nach der Infektion der Zellen mit Togaviren (Sindbis, Semliki Forest Virus) gezeigt werden (Scheele 1970, Schlessinger 1972). Dabei wird jedoch nicht die gesamte virale RNS in ein einziges, hochmolekuares Protein übersetzt. Die Strukturproteine der Oncorna-Viren sind ebenfalls spezifische Spaltprodukte eines viralen Vorläufer-Proteins von 76'000 Dalton Molekulargewicht (Vogt und Eisenmann 1973).

Der Nachweis einer proteolytischen Spaltung von viralen Vorläufer-Proteinen in Virion-Proteine konnte auch bei DNS-Viren (Korant 1974) und bei Bakteriophagen (Laemmli 1970, Georgopoulus 1974) erbracht werden.

II. Material und Methoden

1. Material/Reagenzien, Lieferant, Abkürzung, Literatur

Material/Reagenzien	Lieferant	Abkürzung	Literatur

Die bei Merck erhältlichen Chemikalien wurden ohne Bezeichnung des Lieferanten angeführt!

Aminosäuren:		
^{3}H-Arginin	Radiochemical Center Amersham hergestellt von B. Hirt, ISREC	^{3}H-Arg
^{14}C-Arginin		^{14}C-Arg
^{3}H-Methionin		^{3}H-Met
^{35}S-Methionin		^{35}S-Met

Ammonium-Karbonat

33.5 ml NH_3 (25%)
466.5 ml H_2O

CO_2 durchgasen, bis pH 8.5

Ammoniumsulfat
Special Enzyme Grade — Schwarz/Mann

Aquasol — New England Nuclear

Azetat-Puffer 0.1 M pH 4.0 — Williams 1968

Eisessig	23.68 ml
Na-Azetat	12.24 g
NaCl	292.50 g
Pro 5 Liter	

Borat-Puffer 0.1 M pH 8.5 — Williams 1968

H_3BO_4	30.90 g
$Na_2B_4O_7 \times 10\ H_2O$	47.70 g
NaCl	292.50 g
Pro 5 Liter	

Chromobeads-P — Technicon

Material/Reagenzien	Lieferant	Abkürzung	Literatur
Chromatographie-Puffer -Dünnschichtchromatographie-Puffer iso-Amylalkohol:Pyridin:H_2O = 7:7:6			Gesteland 1969
-Ionenaustauscher-Puffer Puffer A: Eisessig 280 ml Pyridin 3 ml Pro 1 Liter Puffer C: Eisessig 189 ml Pyridin 108 ml Pro 1 Liter Puffer B: 23 Teile Puffer A 1 Teil Puffer C			
Diisopropylfluorophosphat	Fluka	DFP	Perlmann
Earle's Salzlösung			Difco 1968
Gewebekultur-Schalen (Ø 84 mm)	Greiner, Nürtingen BRD		
Hochspannungselektrophorese-Puffer pH 3.5 Pyridin:Eisessig:H_2O = 1:10:189			Gesteland 1969
Homogenisator (Dounce)	Blaessig, Rochester N.Y.		
Hühner-Embryonen (leukosefrei)	Institut Gustave Roussy Villejuif, Paris		
Kodirex X-Ray Film	Kodak		
Kupplungs-Puffer 0.1 M $NaHCO_3$ 0.5 M NaCl			Pharmacia
Natrium-Deoxycholat	Fluka	DOC	
Natrium-Dodecylsulfat	Serva	SDS	
Nonidet-P 40	Shell, Zürich	NP-40	
Pentamidin-Isäthiomat	May & Baker Dagenham England	PI	Perlmann Prouty 1972

Material/Reagenzien	Lieferant	Abkürzung	Literatur

Perameisensäure
0.1 ml H_2O_2
1.9 ml HCOOH
1 Stunde bei Raumtemperatur stehen lassen

Phosphat-Puffer — PBS

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na_2HPO_4 x 10 H_2O	2.88 g
KH_2PO_4	0.20 g

Pro 1 Liter

Polyacrylamid-Gel — PAG

	15% Laufgel	5% Stackinggel
30% Acrylamid	15.00 ml	3.34 ml
1% Bisacrylamid	2.50 ml	5.20 ml
1.5M Tris pH 8.7	8.10 ml	
1.0M Tris pH 6.8		2.50 ml
20% SDS	0.15 ml	0.10 ml
H_2O	4.20 ml	8.80 ml
TEMED	10 µl	10 µl
10% Amm.-Persulfat	100 µl	100 µl

Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Lösungen:

-Puffer-Lösung: Tris 6.0 g
Glyzin 28.8 g
SDS 1.0 g
Pro 1 Liter

-Puffer zur Denaturierung der Proteine:
SDS 0.25 g
1 M Tris pH 6.8 0.4 ml
Glyzerin 0.5 ml
0.2% Bromphenolblau 30 µl
H_2O auf 5 ml
Vor Gebrauch: 50 µl 2-Merkaptoäthanol pro 1 ml Puffer

-Gel-Färbelösung:
Coomassie-Brillant-Blau 2.5 g
Eisessig 70 ml
Methanol 300 ml
H_2O 630 ml

-Entfärbe-Lösung:
Eisessig 70 ml
Methanol 300 ml
H_2O 630 ml

Retikulozyten-Standard-Puffer — RSB

Tris pH 7.5	0.01 M
KCl	0.01 M
$MgCl_2$	0.0015 M

Material/Reagenzien	Lieferant	Abkürzung	Literatur

Rotoren für die Ultrazentrifugation:
- -SW-65-Rotor (Beckman) — Kontron, Zürich
- -Winkel-65-Rotor (Beckman) — Kontron, Zürich
- -SW-27-Rotor (Beckman) — Kontron, Zürich

Scintillations-Flüssigkeit (nach Bray)
- 0.05 g 1,4-Bis-(5-phenyl-2-oxazyl)-Benzol — POPOP
- 5.00 g 2,5-Diphenyloxal (Packard) — PPO
- 1 Liter Toluol

Sprühgerät — C. Desaga, Heidelberg

Suspensions-Puffer

NaCl	0.1	M
Tris pH 7.5	0.05	M
EDTA	0.001	M

Tetramethyläthylendiamin — Matheson & Bell — TEMED

Trichloressigsäure — TCA

Tris(hydroxymethyl)aminometnan — Tris
- 1.5 M Tris pH 8.7
  181.71 g Tris in H_2O lösen (total 900 ml)
  mit konz. HCl pH 8.7 bei Raumtemperatur einstellen
  mit H_2O auf 1 Liter auffüllen
- 1.0 M Tris pH 6.8
  121.14 g Tris in H_2O lösen (total 900 ml)
  mit konz. HCl pH 6.8 bei Raumtemperatur einstellen
  mit H_2O auf 1 Liter auffüllen

Tris-NaCl-Puffer

Tris pH 7.5	0.02	M
NaCl	0.05	M

Tris-NaCl-Detergentien-Puffer

Tris pH 7.5	0.02	M
NaCl	0.05	M
NP-40	0.5	%
DOC	0.5	%

Trypsin - TPCK — Worthington, Biochem.Grp.

Varsol Isopar / M — Esso-Standard, Zürich

Zellulose-Dünnschichtfolien — Marcherey-Nagel, Düren BRD
Polygram cel 300 (20 x 40 cm)

2. Methoden

2.1. Herstellen von Hühner-Fibroblasten-Kulturen

In Hühner-Fibroblasten-Kulturen, die mit Hühner-Leukose-Virus infiziert wurden, werden die synthetisierten Virus-Partikel aus den Wirtszellen ins Medium freigesetzt. Durch Zugabe von radioaktiv markierten Protein-Vorläufern ins Medium wurden die Virus-Proteine markiert. Dadurch konnte mit geringen Proteinmengen gearbeitet werden.

Um Hühner-Fibroblasten-Kulturen herzustellen, wurden den während 10-11 Tagen bebrüteten Hühner-Embryonen die Extremitäten und die Innereien entfernt und der verbleibende Rumpf wurde mit einem Spatel zerkleinert. Die Gewebestücke wurden mit 0.125 % Trypsin in PBS während 30 Minuten bei Raumtemperatur zu einer Zellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden bei niedriger Tourenzahl zentrifugiert und in Medium suspendiert. 10^7 Zellen in 10 ml Eagle's Medium nach Dulbecco (Dulbecco 1954), enthaltend 10% Kälber-Serum, wurden pro Petrischale (Ø 84 mm) ausgesät und in einem CO_2-Inkubator bei 37^o C inkubiert. Der Inkubator wurde mit 8 Liter pro Minute Luft und 0.4 Liter pro Minute CO_2 durchgast. 24 Stunden nach Aussaat wurde das Medium erneuert und 2 Tage danach war die Einzell-Schicht konfluent.

Konfluente Zellschichten wurden mit 37^o C warmem PBS gewaschen und mit 0.125% Trypsin in PBS während 10 Minuten bei 37^o C inkubiert. Die von der Haftfläche der Petrischale abgelösten Zellen wurden zentrifugiert und in Medium suspendiert. Die Sekundärkulturen wurden mit 3 x 10^6 Zellen in 10 ml Eagle's Medium, enthaltend 5% Kälber-Serum, pro Petrischale (Ø 84mm) angesetzt. Die Zellzahl einer konfluenten Einzellschicht betrug ungefähr 10^7 Zellen pro Petrischale.

Um virusinfizierte Hühner-Fibroblasten-Kulturen zu erhalten, wurden pro Petrischale 50 µl leukämisches Hühnerblut-Plasma (ungefähr 10^{12} AMV-Partikel pro ml) in die Zellsuspension pipettiert. Das Hühnerblut-Plasma wurde vor Gebrauch durch ein Sartorius-Filter mit einer Porengrösse von 0.45 µm filtriert.

2.2. In vivo Markierung von Virus-Proteinen

Die Virus-Proteine können nach Markierung mit radioaktiven Protein-Vorläufern selbst in geringsten Mengen nachgewiesen werden.

^{35}S-Met markiertes AMV: Die konfluente Einzellschicht der mit Hühner-Leukose-Virus (AMV) infizierten Zellkulturen wurde mit 3 mal 5 ml 37° C warmem PBS gewaschen. Die Zellen wurden während 4 "Pulse-Chase"-Zyklen mit ^{35}S-Met markiert. Der "Pulse" wurde mit 3 ml methioninfreiem Eagle's Medium, enthaltend 5% dialysiertes Kälber-Serum, und 60 µC ^{35}S-Met durchgeführt. Pro "Chase" wurden 3 ml normales Eagle's Medium auf die Einzellschicht pipettiert. "Pulse" und "Chase" dauerten je 12 Stunden bei 37° C im CO_2-Inkubator. Vor jedem "Pulse" wurde die Zellschicht mit warmem PBS gewaschen, um die Resten des Normalmediums zu entfernen. Die während dem "Pulse" und dem "Chase" aus den Zellen ins Medium freigesetzten Virus-Partikel wurden bei -70° C bis zur Weiterverarbeitung tiefgefroren.

^{14}C-Arg bzw. ^{3}H-Arg markiertes AMV: Gleiche Markierungsmethode wie beim ^{35}S-Met markierten AMV. Es wurden jedoch nur 3 "Pulse-Chase"-Zyklen durchgeführt. Pro "Pulse" wurde in 3 ml argininfreies Eagle's Medium 20 µC ^{14}C-Arg, bzw. 20 µC ^{3}H-Arg und 5% dialysiertes Kälber-Serum zugegeben.

2.3. Reinigung der Virus-Partikel

Die Konzentration der aus den Wirtszellen freigesetzten Virus-Partikel im Medium ist sehr gering. Deshalb wurden die Virionen durch Ultrazentrifugation während 60 Minuten bei 80'000 x g und 4° C sedimentiert. Vorgängig der Ultrazentrifugation wurden die abgestorbenen Zellen und die Zellpartikel in einer Sorvall RC-2B-Zentrifuge bei 10'000 x g aus dem Medium sedimentiert.

Das Sediment nach der Ultrazentrifugation enthielt Virus-Partikel und weiteres hochmolekulares Material. Das Sediment wurde daher in Suspensions-Puffer pH 7.5 aufgenommen und die Virus-Partikel durch

einen 15% - 60% linearen Saccharose-Gradienten gereinigt. Die Ultrazentrifugation wurde während 60 Minuten bei 60'000 UPM und bei 4° C in einem SW-65-Rotor durchgeführt. Der Saccharose-Gradient wurde anschliessend an die Ultrazentrifugation fraktioniert. Von jeder Fraktion wurde eine Probe entnommen und deren Radioaktivität nach TCA-Präzipitation gezählt. Die AMV-Partikel bilden eine Bande bei einer mittleren Dichte von 1.16 g/cm^3 (Bonar 1967). Bei dieser Dichte konnten auch die radioaktiv markierten Virus-Proteine nachgewiesen werden. Die Dichten wurden mit dem Zeiss-Abbe-Refraktometer bei Raumtemeratur bestimmt. Die virusenthaltenden Fraktionen wurden zusammengebracht und gegen Suspensions-Puffer pH 7.5 dialysiert. Die Virus-Suspension wurde nach Zugabe von Saccharose zu einer Endkonzentration von 5% bei -20° C aufbewahrt.

2.4. Aufbrechen der Virus-Partikel

Gereinigte Virus-Partikel konnten durch Zugabe von NP-40 oder SDS (0.5% Endkonzentration) lysiert werden. Durch Zugabe von 4 Volumen bidestilliertem Wasser zu einem Volumen AMV-Suspension (0.98 mg Protein pro ml) konnten die Virus-Partikel nach viermaligem Tiefgefrieren und Auftauen aufgebrochen werden, ohne die Virus-Proteine zu denaturieren. Auf diese Weise aufgebrochene Virus-Partikel wurden für in vitro Spaltungsversuche am viralen Vorläufer-Polypeptid verwendet. Es wurde nicht nachgewiesen, ob durch das viermalige Gefrieren und Auftauen der verdünnten Virus-Suspension alle Virus-Partikel aufgebrochen wurden.

2.5. Auftrennung der gruppenspezifischen Virion-Proteine

Die verschiedenen Proteine in einem Proteingemisch können durch physikalische, chemische oder immunologische Methoden aufgetrennt werden. Die gruppenspezifischen Proteine der Oncorna-Viren konnten durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese oder durch Agarose-Gelfiltration entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

2.5.1. Auftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Das anionische Detergens SDS faltet die Sekundär-Struktur der Proteine auf und bindet an die Polypeptide. Das dadurch negativ geladene Polypeptid wandert im elektrischen Feld der Anode entgegen. Durch den Molekularsiebeffekt im polymerisierten Acrylamid werden die SDS-denaturierten Polypeptide entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die Protein-Suspension wurde lyophilisiert, oder die Proteine wurden mit TCA präzipitiert. Das TCA-Präzipitat wurde lyophilisiert und mit Aether gewaschen, um TCA-Resten aus der Probe zu entfernen. Die Proteine wurden anschliessend in 0.08 M Tris pH 6.8, 5% 2-Merkaptoäthanol, 5% SDS und 0.002% Bromphenolblau suspendiert und während 5 Minuten bei 100 ^{o} C denaturiert.

Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wurden 15% Acrylamid / 0.08% Bisacrylamid in einem Puffer von pH 8.7 zwischen 2 Glasplatten gegossen. Nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) wurde 5% Acrylamid / 0.26% Bisacrylamid in einem Puffer von pH 6.8 über das polymerisierte Laufgel geschichtet. Das überschichtete Gel enthielt Dellen, um die Protein-Proben auf das Gel aufzutragen. Das Laufgel war 14 cm breit, 9 cm hoch und 0.14 cm dick. Die aufgetragenen Proteine durchliefen einen Zentimeter das überschichtete Gel. Die Stromstärke betrug 35 mA. Bromphenolblau im Denaturierungs-Puffer markierte während der Elektrophorese die Pufferfront. Die Elektrophorese dauerte ungefähr 2.5 Stunden (Reid 1968, Blattler 1972).

Nach der Elektrophorese wurden die Polypeptide mit Coomassie-Brillant-Blau in Eisessig-Methanol gefärbt. Anschliessend an die Entfärbung wurde das Gel während mindestens einer Stunde gewässert, unter Vakuum getrocknet (Fairbanks 1965) und autoradiographiert. (Abb. 1)

Die Polypetide enthaltenden Gelbanden wurden aus dem Laufgel herausgeschnitten und die Polypeptide in 0.1% SDS in 25 mM Ammoniumkarbonat pH 8.5 bei 37^{o} C während 24 Stunden eluiert.

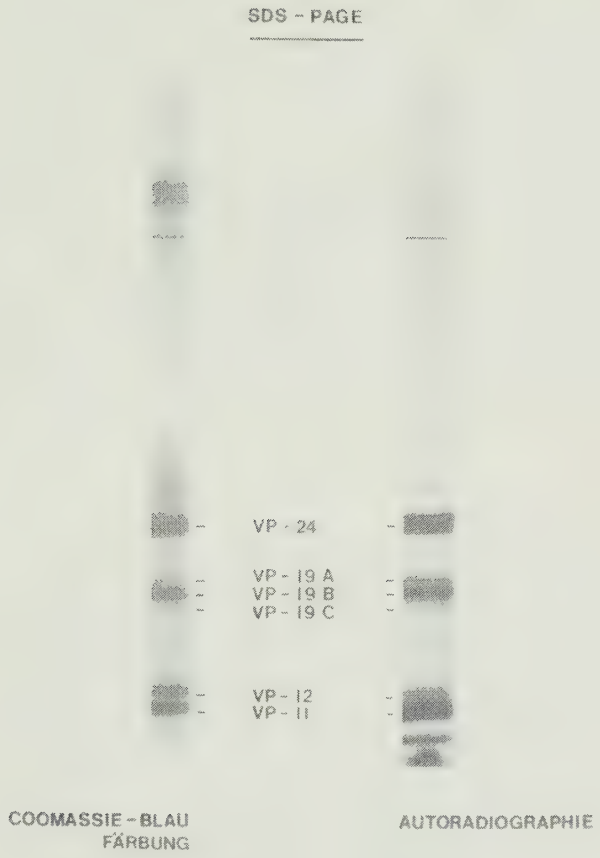


Abb. 1 : SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) der viralen Proteine.
Die viralen Proteine wurden in Elektrophorese-Puffer gelöst und durch das SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschliessend an die Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt, unter Vakuum getrocknet und autoradiographiert (siehe Text).

2.5.2. Auftrennung durch Agarose-Gelfiltration

Die gs-Virion-Proteine von Oncorna-Viren wurden durch eine Agarose-Säule mit 6 M Guanidin-HCl entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Auftrennung der gs-Proteine von AMV durch Agarose A-5M Gelfiltration wurde von Vogt V., Institut für allgemeine Mikrobiologie der Universität Bern, ausgeführt. Er hielt sich dabei an die Vorschriften von E. Fleissner (Fleissner 1971). Der pH des 6 M Guanidin-HCl-Puffers wurde durch Zugabe von 0.05 M Natrium-Phosphat von pH 6.5 auf pH 5.4 verändert. Dem Puffer wurde 0.01 M Dithiothreitol zugegeben. Die Durchflussgeschwindigkeit des Puffers durch die Säule betrug 0.85 ml pro Stunde. Die Höhe der Säule betrug 100 cm und der Durchmesser 1.3 cm. Die durch Agarose-Gelfiltration aufgetrennten gs-Proteine wurden gegen 1 mM Tris pH 7.5 dialysiert.

2.6. Tryptische Spaltung der Polypeptide

Das proteolytische Enzym Trypsin hydrolisiert die Peptidbindungen nach Arginin oder Lysin. Dadurch besitzen alle Peptide am C-terminalen Ende ein Arginin oder Lysin. Einzig das C-terminale Peptid der Polypeptidkette kann eine beliebige Aminosäure enthalten. Da Trypsin eine schwache chymotryptische Aktivität aufweist, wurde es in Verbindung mit dem Chymotrypsin-Hemmer TPCK (L-1-Tosylamid-2-Phenyl-Aethylchloromethyl Keton) angewendet. Wenn eine der beiden Aminosäuren am N-terminalen Ende des Peptids steht oder ein Prolin C-terminal dem Arginin folgt, spaltet das Enzym diese Arginin- oder Lysin-Resten nicht von der Peptidkette ab.

Die mit 0.1% SDS aus dem Polyacrylamidgel eluierten Polypeptide wurden in Gegenwart von 60 µg Rinderserum-Albumin (1 mg/ml) als Träger mit TCA (20% Endkonzentration) präzipitiert, das lyophilisierte Präzipitat mit Aether gewaschen und in 50 mM Ammoniumkarbonat pH 8.5 suspendiert. Nach einer zweiten TCA-Präzipitation konnten mehr als 99% der SDS-Resten aus der Polypeptid-Suspension entfernt werden. Die durch Agarose-Gelfiltration aufgetrennten und gegen 1 mM Tris pH 7.5 dialysierten gs-Proteine wurden einmal in Gegenwart von 60 µg Rinder-Serum-Albumin TCA-präzipitiert. Das Präzipitat wurde ebenfalls mit Aether gewaschen.

Die äthergewaschenen Polypeptide wurden mit 0.1 ml Perameisensäure bei 4° C während einer Stunde oxydiert. Dabei wurden alle Methionine zu Sulfon-Methionin oxydiert. Die Oxydation wurde durch Verdünnung der Perameisensäure mit 1 ml Wasser gestoppt. Die Polypeptid-Lösung wurde gefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde nochmals in 0.5 ml Wasser gelöst und wieder lyophilisiert, um die Perameisensäuren-Resten zu evaporieren. Die oxydierten Polypeptide wurden mit Trypsin-TPCK in 0.05 M Ammoniumkarbonat pH 8.5 während 2 Stunden bei 37° C gespalten. Das Enzym-Substrat-Verhältnis betrug 1:5 bis 1:10. Massgebend für die Substratkonzentration war einzig die Menge von Rinder-Serum-Albumin. Die tryptisch gespaltenen Polypeptide wurden lyophilisiert und die Peptide in Hochspannungselektrophorese-Puffer pH 3.5 oder Ionenaustauscher-Puffer A gelöst.

2.7. Auftrennung der Peptide

Die Peptide wurden auf dem gleichen Träger durch Elektrophorese in einer Richtung und durch aufsteigende Adsorptions-Chromatographie in der senkrechten Richtung zur Elektrophorese zweidimensional aufgetrennt. Die Peptide wurden auch durch eine Kationenaustauscher-Säule eindimensional aufgetrennt.

2.7.1. Zweidimensionale Auftrennung der Peptide durch Elektrophorese und Chromatographie

Hochspannungs-Elektrophorese: Die im Handel erhältlichen Zellulose-Dünnschichtfolien "Polygram cel 300" (20 x 40 cm) wurden vorerst in Methanol gewaschen. Die Elektrophorese wurde in der Längsrichtung der Folie durchgeführt. Eine 1 cm breite Startlinie wurde 3 cm vom Folienrand entfernt aufgezeichnet und die in Hochspannungselektrophorese-Puffer gelösten Peptide mit Glaskapillaren aufgetragen. Die Zellulose-Dünnschichtfolie wurde mit Hilfe eines Sprühgerätes mit Hochspannungs-Elektrophorese-Puffer vollständig benetzt. Die benetzte Folie wurde

derart in die organische Lösung Varsol getaucht, dass die beiden Enden an die Kathode und an die Anode angeschlossen werden konnten. Das Varsol-Bad wurde während der Elektrophorese auf 20° C gekühlt. Der Elektrophorese-Puffer hatte einen pH von 3.5, weshalb alle Peptide der Kathode entgegenwanderten. Die Elektrophorese wurde bei 1250 Volt durchgeführt und dauerte ungefähr 2 Stunden. Zur Standardisierung der Elektrophoresedauer wurde gleichzeitig eine Farbstoffmischung (Xylen / Eastman Orange G / Cyanol FF / Saures Fuchsin) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Farbstoffmischung wanderte der Anode entgegen.

Chromatographie: Eine aufsteigende Adsorptionschromatographie wurde rechtwinklig zur Elektrophorese durchgeführt. Der Chromatographie-Puffer enthielt iso-Amylalkohol, Pyridin und Wasser im Verhältnis 7:7:6 (Gesteland 1969).

2.7.2. Auftrennung der Peptide durch "Chromobead-P" Ionenaustauscher-Säule

Die Peptide wurden durch eine Säule von 1.3 cm Durchmesser und 19 cm Höhe aufgetrennt. Die Säule wurde auf 50° C aufgewärmt. Das Elutionsvolumen betrug ungefähr 3 ml pro Fraktion, total 360 ml. Der exponentielle Gradient enthielt im säulennahen Messzylinder 120 ml Puffer A, im mittler Messzylinder 120 ml Puffer B und im säulenentfernteren Messzylinder 120 ml Puffer C. Der Innendurchmesser der Messzylinder betrug 4.5 cm. Die Gefässe waren am Grunde der Messzylinder in Serie miteinander verbunden, und die Puffer im säulennahen und mittleren Messzylinder wurden während der exponentiellen Verdünnung mit dem Magnetrührer gemischt. Der Puffer wurde mit einer peristaltischen Perpex-Pumpe durch die Säule gepumpt. Die Durchlaufgeschwindigkeit des Puffers durch die Säule betrug 20 ml pro Stunde. Die gesammelten Fraktionen wurden im Trockenschrank bei einer Lufttemperatur von 120° C getrocknet und die Peptide in 0.2 ml 0.01 M HCl gelöst. Nach Zugabe von 3.5 ml Aquasol wurde die Radioaktivität im Beckman Scintillationszähler bestimmt. Bei allen Peptidanalysen wurden Markerpeptide mitchromatographiert.

Auswertung der rohen Zähldaten: Die im ^{3}H-, ^{14}C- und ^{35}S-Kanal ermittelten Background-Werte wurden subtrahiert und der berechnete Anteil von ^{14}C bzw. ^{35}S im ^{3}H-Kanal (Spillover) wurde korrigiert. Der korrigierte Anteil von ^{14}C im ^{3}H-Kanal betrug 9% und jener von ^{35}S im ^{3}H-Kanal betrug 6.8%.

2.8. Immunpräzipitation der Virus-Antigene

Durch Immunpräzipitation konnten die Virus-Proteine aus dem Lysat von virusinfizierten Zellen ausgefällt werden. Die Immunpräzipitation ist nötig, da nach 30 Minuten Markierung der virusinfizierten Zellen mit ^{35}S-Met nur 1%-2% der markierten Proteine virusspezifisch sind.

Herstellen von Immunserum: Das Immunserum wurde nach Immunisierung eines Kaninchens mit AMV-Proteinen erhalten. Die Tiere wurden ein erstes Mal mit 1 mg AMV-Proteinen immunisiert. Die Virus-Suspension (1.28 mg Protein pro ml) wurde vor subkutaner Injektion mit 0.5% NP-40-Endkonzentration lysiert. Das Lysat wurde mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 1.25 ml gebracht und mit 1.25 ml Freund's-Adjuvans emulgiert. Nach 2 Monaten wurde mit 0.5 mg NP-40-lysiertem AMV und Freund's Adjuvans subkutan nachinjiziert. 10 Tage später wurde dem Kaninchen aus der Ohrvene ungefähr 30 ml Blut entnommen. Das daraus gewonnene Serum wurde für Immunpräzipitationen verwendet. Das gleiche Kaninchen wurde in Abständen von mindestens 2 Monaten mehrmals geblutet. 10 Tage vor jeder Blutentnahme wurden 0.5 mg lysiertes AMV subkutan injiziert. Das Immunserum präzipitierte aus dem Lysat von AMV-infizierten Hühner-Fibroblasten gs-Virion-Antigene, die nach Auftrennung durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ein Molekulargewicht von 24'000, 19'000, 12'000 und 11'000 Dalton aufwiesen. Die viralen Vorläufer-Polypeptide von 76'000, 66'000 und 55'000 Dalton und ein nichtvirales Polypeptid von 45'000 Dalton Molekulargewicht wurden mit dem gleichen Immunserum präzipitiert (Vogt V. et al.).

Immunpräzipitation: Zu 1 ml radioaktiv markierter, heterogener Polypeptid-Suspension in Tris-NaCl-Puffer, enthaltend 0.5% NP-40 und 0.5% DOC, wurden 3 µg unmarkierte AMV-Proteine als Träger pipettiert. In Vorversuchen wurde diese Menge unmarkierter AMV-Proteine bestimmt, um mit 0.1 ml Kaninchen-Antiserum in 1.1 ml Totalvolumen eine maximale Immunpräzipitation zu erreichen. NP-40 und DOC lysieren die Virus-Partikel. 0.1 ml Kaninchen-Antiserum wurde der radioaktiv markierten Polypeptid-Suspension zugegeben. Die virusspezifischen Antigene wurden über Nacht bei 4° C immunpräzipitiert. Der Immunkomplex wurde bei ungefähr 1'000 x g zentrifugiert und das Sediment zweimal mit Tris-NaCl-Detergentien-Puffer gewaschen und wieder zentrifugiert. Der gewaschene Immunkomplex wurde durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert oder für Inkubationen mit Virusfraktionen und Zell-Lysaten verwendet.
In Gegenwart von 0.5% SDS anstelle von NP-40 und DOC immunpräzipitierten die viralen Polypeptide qualitativ und quantitativ ähnlich.

2.9. Herstellen von Zell-Lysaten

Die Hühner-Fibroblasten konnten mit Detergentien lysiert, oder im Homogenisator oder durch Ultrabeschallung homogenisiert werden.

Detergentien-Lysat: Konfluente Einzellschichten von virusinfizierten oder uninfizierten Hühner-Fibroblasten wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen und mit Tris-NaCl-Puffer, enthaltend 0.5% NP-40 und 0.5% DOC, von der Haftfläche abgelöst. Die Zell-Suspension wurde 30 Sekunden auf einem Vortex-Apparat kräftig geschüttelt und das Zell-Lysat während 10 Minuten bei 10'000 UPM in der Sorvall-RC-2B-Zentrifuge zentrifugiert, um die nichlysierten, hochmolekularen Zell-Fragmente und die Zellkerne zu sedimentieren. Bei der Lyse der Zellen mit 0.5% SDS anstelle von NP-40 und DOC wurden auch die Zellkerne lysiert.

Zell-Homogenat: Die gewaschenen Zellen wurden mit RSB überschichtet und während 20 Minuten auf Eis stehen gelassen. Der hypotonische Puffer quellt die Zellen auf. Die Zellen wurden

mechanisch von der Haftfläche abgelöst und in einem Blaessig-Homogenisator (2 ml Volumen) mit 15 Pistill-Streichen aufgebrochen. Die Zellkerne wurden während 4 Minuten bei 700 x g zentrifugiert und das Sediment zweimal in RSB suspendiert, wiederum homogenisiert und zentrifugiert. Der kernfreie Ueberstand nach der Zentrifugation enthielt auch die Zellmembranen.

Ultrabeschalltes Zell-Lysat: Die gewaschenen Zellen wurden mit 0.5 ml Tris-NaCl-Puffer mechanisch von der Haftfläche abgelöst und dreimal während 5 Sekunden ultrabeschallt (Branson-Sonifier Stufe 5). Während der Ultrabeschallung wurde das Proberöhrchen in Eiswasser gekühlt.

III. Tryptische Peptidmuster der gruppenspezifischen Virion-Proteine von Hühner-Leukose-Viren (Avian Myeloblasosis Virus)

3. Problemstellung

Das Hühner-Leukose-Virus (AMV), ein Oncorna-Virus der Leukose-Gruppe, kann aus dem Medium von infizierten Hühner-Fibroblasten-Kulturen oder aus dem Blutplasma von AMV-infizierten Hühnern isoliert werden. Die Virionen enthalten 60%-70% Proteine, 20%-30% Lipide, 2% Kohlenwasserstoffe und 1% Ribonukleinsäure (RNS) (Tooze 1973). Die einsträngige RNS weist ein Molekulargewicht von 10-12 x 10^6 Dalton auf. Den Hauptanteil der Virion-Proteine bilden die gruppenspezifischen (gs)-Proteine, die durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) oder durch Agarose-Gelfiltration aufgetrennt werden konnten. Die Molekulargewichte der gs-Proteine wurden mit Hilfe von Standard-Proteinen, deren Molekulargewichte bekannt sind, bestimmt (Weber und Osborn 1969, Vogt V. et al.). Die errechneten Molekular-Gewichte der durch SDS-PAGE oder durch Agarose-Gelfiltration aufgetrennten gs-Proteine stimmen nicht überein. Die nachstehende Tabelle zeigt die verschiedenen Werte auf (Vogt V. et al.):

Verwendete Bezeichnung der gs-Proteine	SDS-PAGE Mol.-Gew. (Dalton)	Agarose-Gelfiltration Molekulargewicht (Dalton)
VP-24	24'000	27'700
VP-19	19'000	17'000/19'000 (Doppelbande)
VP-12	12'000	10'000
VP-11	11'000	14'000
p-5	-	7'000

In der Literatur werden abweichende Werte angegeben (Fleissner 1971, August 1974).

Die 4 gs-Proteine von AMV sind Spaltprodukte des viralen Vorläufer-Proteins von 76'000 Dalton Molekulargewicht (Vogt und Eisenmann 1973) und sind immunologisch voneinander unterscheidbar (Fleissner 1971, Bolognesi 1970). Die virale Vorläufer-Polypeptidkette wäre genügend

lang, um die 4 gs-Virion-Proteine in Serie zu enthalten. In einem Virus-Partikel sind die verschiedenen gs-Proteine nicht in der gleichen Anzahl vorhanden. Pro Virion wurden 3'000 VP-24-Moleküle, 1'800 VP-19-Moleküle, 2'000 VP-12-Moleküle und 3'000 VP-11-Moleküle berechnet (Fleissner 1971). Dies könnte ein schwacher Hinweis sein, dass die viralen Vorläufer-Polypeptide überlappend gespalten werden. Ein solches Beispiel, bei dem mehrere Moleküle des gleichen Proteins durch proteolytische Enzyme verschieden gespalten werden, konnte bis anhin noch nicht gezeigt werden. Eine Kartierung der Peptide aller gs-Virion-Proteine könnte deshalb wesentlich zum Verständnis der viralen Struktur-Proteine beitragen.

Im Folgenden wurden die viralen gs-Proteine radioaktiv markiert. Durch den Einbau einer radioaktiven Aminosäure in die viralen Proteine sind nach tryptischer Spaltung wahrscheinlich nicht alle Peptide markiert. Daraus resultiert ein einfacheres Peptidmuster, als nach dem Einbau meherer radioaktiver Aminosäuren in die Proteine. Ein einfaches Peptidmuster konnte nach der Markierung der viralen Proteine mit ^{35}S-Methionin erhalten werden. Diese Peptid-Analysen genügten jedoch nicht, um verbindliche Schlüsse zu ziehen. Deshalb wurden die viralen Proteine mit radioaktivem Arginin markiert. Ungefähr die Hälfte aller tryptischen Peptide konnte somit durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Die Peptide wurden durch zwei verschiedene Methoden aufgetrennt, um für jedes virale Polypeptid ein charakteristisches Peptidmuster zu erhalten.

Die Peptidmuster aller Methionin oder Arginin markierten gs-Virion-Proteine wurden schematisch dargestellt und diskutiert.

4. Resultate

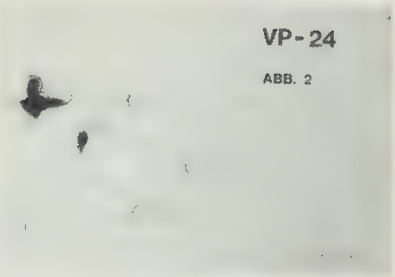
4.1. Peptidmuster nach zweidimensionaler Auftrennung der Peptide durch Elektrophorese und Chromatographie

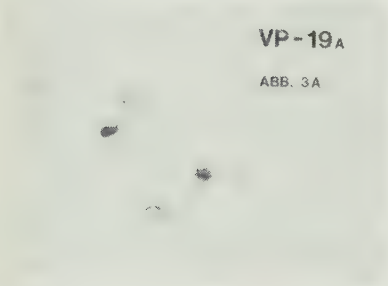
4.1.1. ^{35}S-Methionin markierte Virion-Peptide

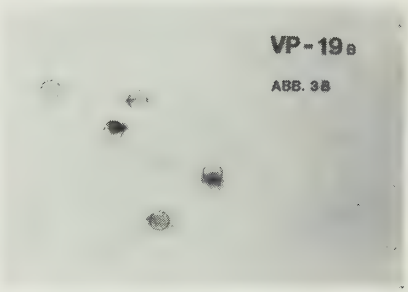
Die ^{35}S-Met markierten gs-Virion-Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt, die Polypeptide mit 0.1% SDS aus dem Gel eluiert und zweimal mit TCA präzipitiert. Anschliessend wurden die Polypeptide mit Perameisensäure oxydiert und mit Trypsin gespalten. Die Peptide wurden durch Hochspannungs-Elektrophorese bei pH 3.5 und durch aufsteigende Chromatographie zweidimensional aufgetrennt. Die markierten Peptide wurden durch Autoradiographie (Kodirex X-Ray-Film, Kodak) nachgewiesen. Die Grösse und die radioaktive Intensität der Peptidflecken auf dem Autoradiogramm waren unterschiedlich. Ungeachtet dieser quantitativen Unterschiede wurden sämtliche markierte Peptidflecken ausgewertet:

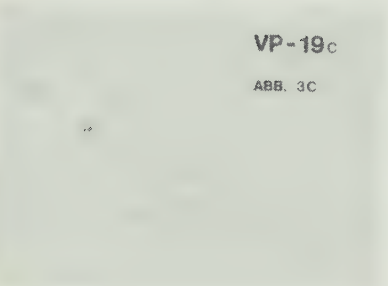
Beim VP-24 konnten 9 markierte Peptide nachgewiesen werden (Abb. 2). Das VP-19 wurde durch SDS-PAGE in drei Polypeptidbanden aufgetrennt (Abb. 1). Die drei aufgetrennten Polypeptide wurden einzeln vom SDS-Gel eluiert und tryptisch gespalten. Die Peptidmuster der 3 markierten Polypeptide des VP-19 waren ähnlich (Abb. 3 A-C). 5 Peptidflecken konnten durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Das VP-12 und das VP-11 konnten durch SDS-PAGE nur ungenügend aufgetrennt werden. Deshalb enthält das Peptidmuster des einen Proteins möglicherweise Peptide des andern Proteins. Beim VP-12 konnten 7 markierte Peptide (Abb. 4) und beim VP-11 6 Peptide (Abb. 5) nachgewiesen werden. Zum Vergleich wurden die ^{35}S-Met markierten Gesamtproteine von AMV-Partikeln ebenfalls oxydiert und tryptisch gespalten. Nach zweidimensionaler Auftrennung konnten die gleichen markierten Peptide wie bei den aufgetrennten gs-Virion-Proteinen und einige zusätzliche markierte Peptide nachgewiesen werden (Abb. 6).

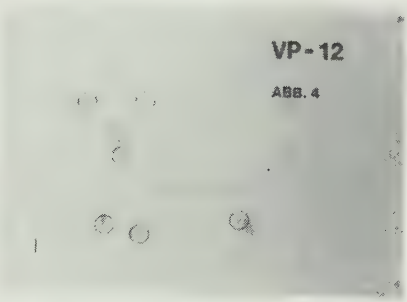
In Abb. 7 sind die markierten Peptide nach zweidimensionaler Auftrennung durch Elektrophorese und Chromatographie in einer Uebersicht dargestellt. 3 der 9 markierten Peptide des VP-24 besassen keine

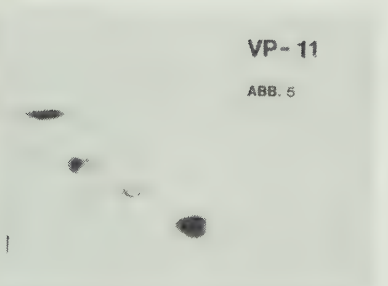












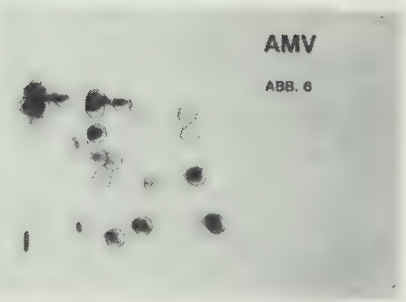


Abb. 2 - 6: Die ^{35}S-Met markierten Virion-Proteine wurden nach tryptischer Spaltung zweidimensional durch Elektrophorese und Chromatographie aufgetrennt. Die tryptischen Peptide wurden auf die Start-Linie aufgetragen und vorerst durch Elektrophorese in einem Puffer von pH 3,5 bei 1250 Volt aufgetrennt. Anschliessend wurden die Peptide senkrecht zur Elektrophorese durch aufsteigende Chromatographie in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die ^{35}S-Met markierten Peptide wurden durch Autoradiographie (Kodirex x-ray film, Kodak) nachgewiesen. Die stark und schwach markierten Peptidflecken der verschiedenen gs-Virion-Proteine wurden ausgewertet. Die ausgewerteten Peptidflecken sind auf den Abbildungen eingekreist. In Abb. 6 wurden die markierten Proteine von gereinigten AMV-Partikeln tryptisch gespalten und die Peptide durch Autoradiographie nachgewiesen.

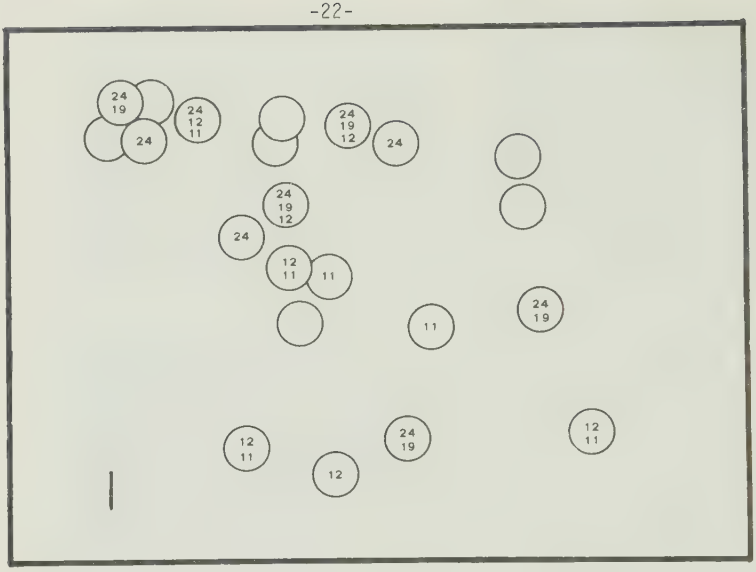


Abb. 7 : Uebersicht der tryptischen Peptide der verschiedenen, ^{35}S-Met markierten gs-Virion-Proteine nach Auswertung sämtlicher Peptid-Flecken nach der Autoradiographie. Die Kreise symbolisieren die markierten Peptide und die Zahlen stehen für die entsprechenden gs-Proteine: 24 für VP-24 usw. Die Kreise ohne Zahlen symbolisieren Peptide, die nur bei den Gesamt-Proteinen von AMV nachgewiesen werden konnten.

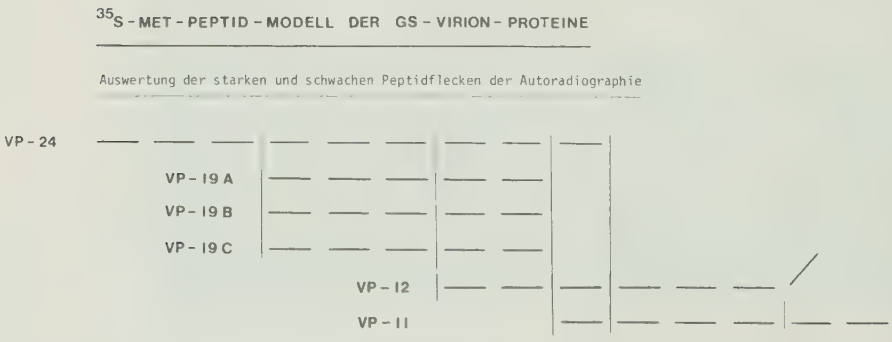


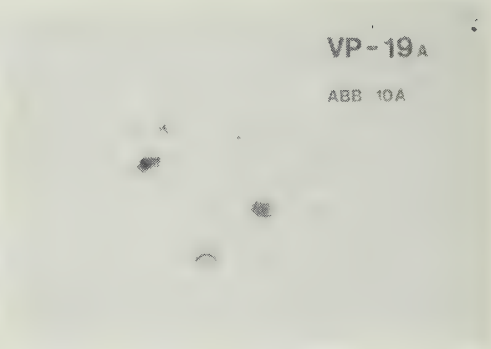
Abb. 8 : Schematische Darstellung der tryptischen Peptide nach Auswertung sämtlicher Peptidflecken nach der Autoradiographie. Die ähnlichen Peptide sind senkrecht untereinander dargestellt.

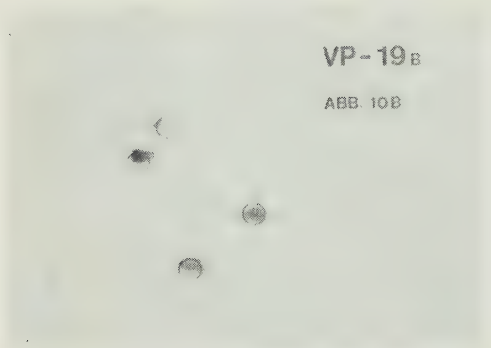
ähnlichen Mobilitätseigenschaften mit den Peptiden der andern gs-Virion-Proteine. Ebenso wanderten ein Peptid des VP-12 und 2 Peptide des VP-11 ungleich wie alle andern Peptide der gs-Virion-Proteine. 3 markierte Peptide des VP-24 zeigten nach zweidimensionaler Auftrennung ähnliche Mobilitätseigenschaften mit 3 Peptiden des VP-19 und 2 markierte Peptide des VP-24 mit 2 Peptiden des VP-19 und des VP-12. Ein markiertes Peptid des VP-24 wanderte ähnlich wie ein markiertes Peptid des VP-12 und des VP-11.

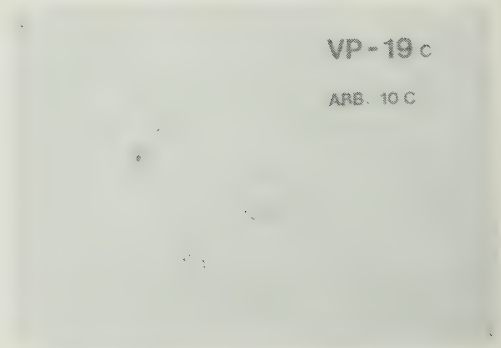
Nach der Auswertung sämtlicher Peptidflecken der Autoradiographien konnten die Peptidmuster aller gs-Virion-Proteine in einem Modell aufgezeichnet werden, das eine überlappende Spaltung von Vorläufer-Proteinen in gs-Virion-Proteine darstellt (Abb. 8). Da die 5 markierten Peptide des VP-19 gleich wanderten wie 5 der 9 markierten Peptide des VP-24, konnte gefolgert werden, dass das VP-19 ein Teilstück des VP-24 ist. Das VP-12 überlappt teilweise das VP-24 und das VP-19. 4 markierte Peptide des VP-12 hatten ähnliche Mobilitätseigenschaften mit 4 markierten Peptiden des VP-11. Das VP-24 und das VP-11 besassen ein ähnliches markiertes Peptid.

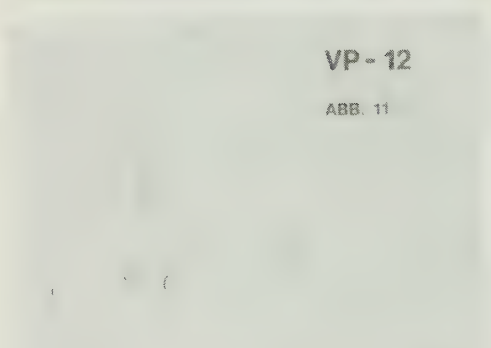
Das Peptidmuster-Modell aller gs-Virion-Proteine liesse auf einen bis anhin nicht nachgewiesenen Spaltungsprozess an Vorläufer-Proteinen schliessen. Es ist nicht bekannt, dass mehrere Moleküle des gleichen Proteins durch proteolytische Enzyme verschieden gespalten werden können. Zudem können einzelne Peptide eines Polypeptids aus stöchiometrischen Gründen nicht mehr als zehnmal höhere Radioaktivitäten aufweisen als andere Peptide der gleichen Polypeptidkette. Da die schwachen Peptidflecken auf den Autoradiogrammen ein Nebenprodukt irgendwelcher Art darstellen könnten, versuchte ich, einzig die stark markierten Peptide der gleichen Autoradiogramme auszuwerten:

Das VP-24 wies 3 stark markierte Peptidflecken auf (Abb. 9), die nach zweidimensionaler Auftrennung keine gemeinsamen Mobilitäten mit den Peptiden der andern gs-Proteine hatten. Das VP-19 zeigte 4 stark markierte Peptide (Abb. 10 A-C). 3 davon besassen Auftrennungseigenschaften, die bei keinem andern gs-Protein nachgewiesen werden konnten. Ein Peptid des VP-19 wanderte ähnlich wie ein Peptid des VP-12. Beim VP-12 konnten 5 stark markierte Peptide (Abb. 11) und beim VP-11









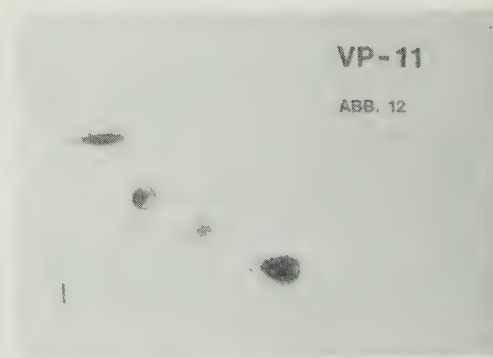


Abb. 9 - 12: Von den gleichen Autoradiographien wie in den Abb. 2 - 6 wurden einzig die stark markierten, ^{35}S-Met-Peptidflecken ausgewertet. Die ausgewerteten Peptidflecken sind wiederum in den Abbildungen eingekreist.

3 stark markierte Peptide nachgewiesen werden (Abb. 12). 2 markierte Peptide des VP-12 und des VP-11 hatten gemeinsame Mobilitätseigenschaften. In Abb. 13 wurden die stark markierten Peptide aller gs-Virion-Proteine in einer Uebersicht dargestellt. Das Peptidmuster-Modell aller gs-Proteine (Abb. 14) zeigt ein gemeinsames Peptid beim VP-19 und beim VP-12. Die Ueberlappung des VP-12 mit dem VP-11 könnte in der ungenügenden Auftrennung der beiden Polypeptide durch SDS-PAGE gründen.

Die Peptidmuster, die mit ^{35}S-Met markierten Proteinen erhalten wurden, waren einfach. Dennoch konnten die Resultate nicht eindeutig ausgewertet werden. Diese einfachen Peptidmuster besassen zu wenig Information, um eine Antwort auf die Frage des Spaltungsprozesses am viralen Vorläufer-Protein zu geben. Deshalb wurden die viralen Proteine mit ^{14}C-Arg markiert, um mehr markierte Peptide zu erhalten.

4.1.2. ^{14}C-Arginin markierte Virion-Peptide

Die vom SDS-Gel eluierten, ^{14}C-Arg markierten gs-Virion-Polypeptide wurden nach zweimaliger TCA-Präzipitation oxydiert und tryptisch gespalten. Die Peptide wurden durch Elektrophorese und Chromatographie zweidimensional aufgetrennt und die markierten Peptide durch Autoradiographie nachgewiesen.

Nach den Autoradiographien der verschiedenen gs-Proteine wurden einzig die stark markierten Peptide ausgewertet. Das VP-24 wies 14 stark markierte Peptide auf (Abb. 15). Das VP-19 wurde durch SDS-PAGE in einer Doppelbande aufgetrennt. Die zwei aufgetrennten Polypeptide wurden einzeln aus dem Gel eluiert und tryptisch gespalten. Nach zweidimensionaler Auftrennung zeigten sich zwei ähnliche Peptidmuster mit 5 markierten Peptiden (Abb. 16 A-B). Die beiden Peptidflecken I und II am untern rechten Rand der Autoradiographie konnten bei allen gs-Proteinen nachgewiesen werden und wurden nicht weiter analysiert. Es darf angenommen werden, dass es keine Peptide der gs-Proteine sind. Das VP-12 wies 10 stark markierte (Abb. 17) und das VP-11 ebenfalls 10 stark markierte Peptidflecken auf (Abb. 18). Die bei allen Autoradiographien mit ^{14}C-Arg markierten Peptiden nachge-

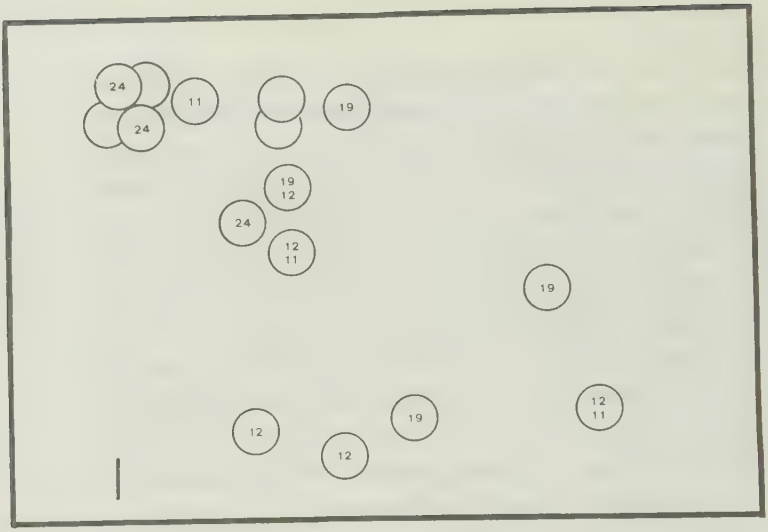


Abb. 13 : Uebersicht der tryptischen Peptide der verschiedenen, ^{35}S-Met markierten gs-Virion-Proteine nach Auswertung der starken Peptid-Flecken nach der Autoradiographie. (siehe Legende Abb. 7)

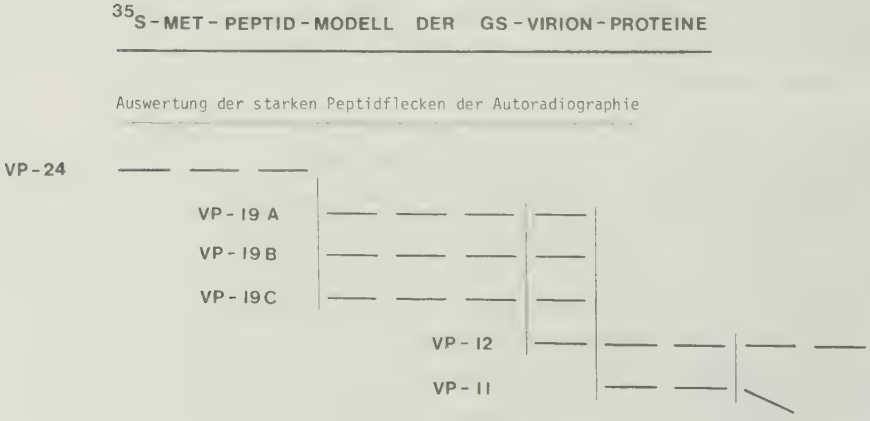
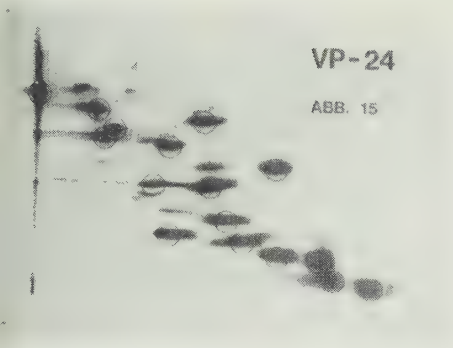
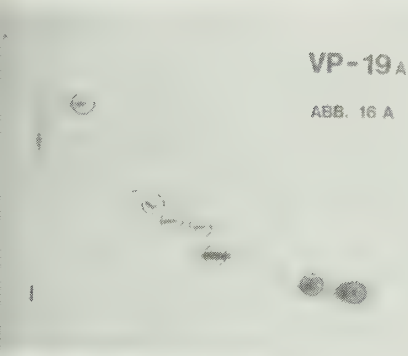
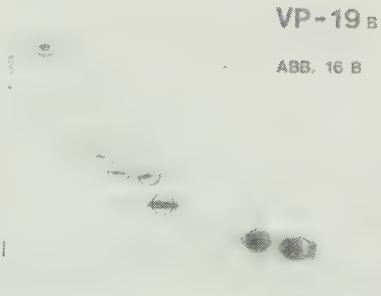
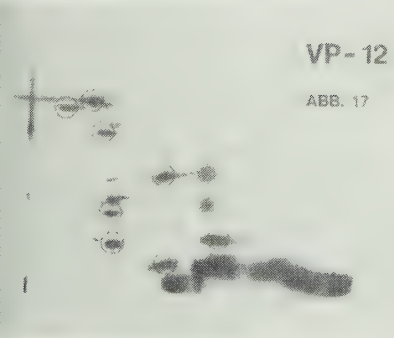


Abb. 14 : Schematische Darstellung der tryptischen Peptide nach Auswertung der starken Peptidflecken nach der Autoradiographie. Die ähnlichen Peptide sind senkrecht untereinander dargestellt.









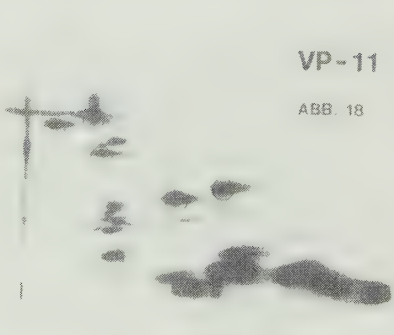


ABB. 15 - 18: ZWEIDIMENSIONALE AUFTRENNUNG DER ^{14}C-ARG MARKIERTEN, TRYPTISCHEN PEPTIDE DER VERSCHIEDENEN GS-VIRION-PROTEINE. NACH DER AUTORADIOGRAPHIE WURDEN EINZIG DIE STARK MARKIERTEN PEPTIDFLECKEN AUSGEWERTET. DIE AUSGEWERTETEN PEPTIDFLECKEN SIND IN DEN ABBILDUNGEN EINGEKREIST.

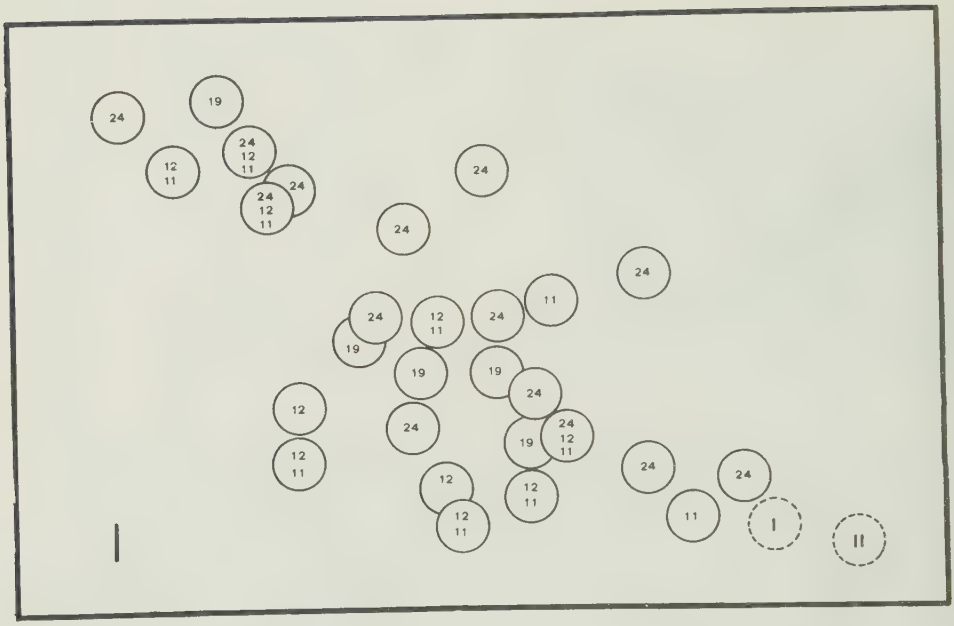


Abb. 19 : Uebersicht der tryptischen Peptide der verschiedenen, ^{14}C-Arg markierten gs-Virion-Proteinen nach Auswertung der starken Peptidflecken nach der Autoradiographie. Die Kreise symbolisieren die markierten Peptide, und die Zahlen stehen für die gs-Virion-Proteine: 24 für VP-24 usw. Die Peptidflecken I und II sind möglicherweise keine Peptide der verschiedenen gs-Proteine (siehe Text).

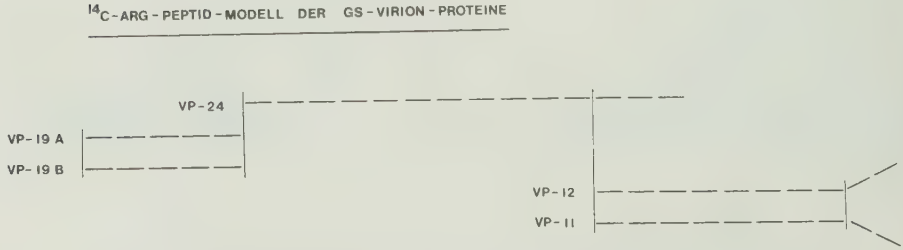


Abb. 20 : Schematische Darstellung der tryptischen, ^{14}C-Arg markierten Peptide nach Auswertung der starken Peptidflecken nach der Autoradiographie. Die ähnlichen Peptide sind senkrecht untereinander dargestellt.

wiesenen Peptidflecken I und II wurden wiederum nicht ausgewertet. Die stark markierten Peptide aller gs-Virion-Proteine wurden in einer Uebersicht in Abb. 19 dargestellt. Das Peptidmuster-Modell (Abb. 20) zeigt wiederum eine minimale Ueberlappung einzelner Polypeptide, ähnlich dem Modell der stark markierten Peptidflecken der ^{35}S-Met markierten Polypeptide (Abb. 14). Das VP-24 besitzt 3 markierte Peptide, die ähnliche Mobilitätseigenschaften mit 3 markierten Peptiden des VP-12 und des VP-11 aufweisen. Die markierten Peptide des VP-19 wanderten ungleich wie die markierten Peptide aller andern gs-Proteine. Die Ueberlappung des VP-12 mit dem VP-11 könnte wiederum in der ungenügenden Auftrennung der beiden Polypeptide durch SDS-PAGE gründen.

Bei der Auswertung der Autoradiographien war es eine willkürliche Entscheidung, welche Peptidflecken im Grenzfalle als stark markierte und welche als schwach markierte bezeichnet werden können. Durch das Auszählen der Radioaktivitäten der einzelnen markierten Peptide könnten diese Grenzen bestimmt werden. Deshalb wurden die Peptide durch die Kationenaustauscher-Säule fraktioniert und die Zählraten pro Fraktion bestimmt. Es konnten dabei auch doppeltmarkierte Proben aufgetrennt werden.

4.2. Peptidmuster nach Auftrennung der Peptide durch "Chromobead-P" Ionenaustauscher-Säule

4.2.1. ^{3}H-Arginin markierte Virion-Peptide

Die durch Agarose-Gelfiltration aufgetrennten gs-Virion-Polypeptide wurden dialysiert, TCA-präzipitiert, oxydiert und tryptisch gespalten. Die Peptide wurden durch eine "Chromobead-P" Kationenaustauscher-Säule aufgetrennt. Die gesammelten Fraktionen wurden getrocknet und die Zählraten pro Fraktion bestimmt. Die ^{3}H-Arg markierten Peptide wurden zusammen mit ^{35}S-Met markierten Peptiden von AMV als Markerpeptide durch die Säule aufgetrennt.

Die fraktionierten, markierten Peptide des VP-24 wurden in Abb. 21 dargestellt. Eine Uebersicht der fraktionierten Peptide aller gs-Virion-Proteine wurde in Abb. 22 gegeben. Dabei wurden auch die

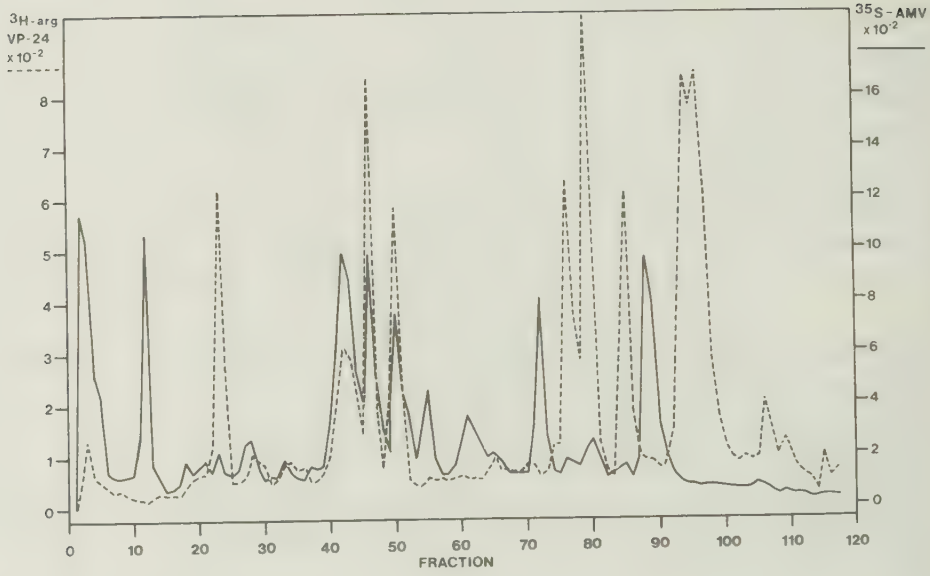


Abb. 21 : Fraktionierungs-Muster der ^{3}H-Arg markierten, tryptischen Peptide des VP-24. Die gs-Virion-Proteine wurden vor der tryptischen Spaltung durch Agarose-Gelfiltration aufgetrennt. Die tryptischen Peptide wurden durch eine "Chromobead-P" Kationenaustauscher-Säule mit Hilfe eines exponentiellen Puffer-Gradienten (Puffer A, B, C siehe Material und Methoden) aufgetrennt. Die gesammelten Fraktionen wurden im Trockenschrank bei einer Lufttemperatur von 120° C getrocknet. Nach Zugabe von 0.2 ml 0.01 M HCl und 3.5 ml Aquasol wurden die Zählraten der einzelnen Fraktionen bestimmt. Als Markerpeptide wurden gleichzeitig die tryptischen Peptide von ^{35}S-Met markiertem AMV durch die Säule aufgetrennt.

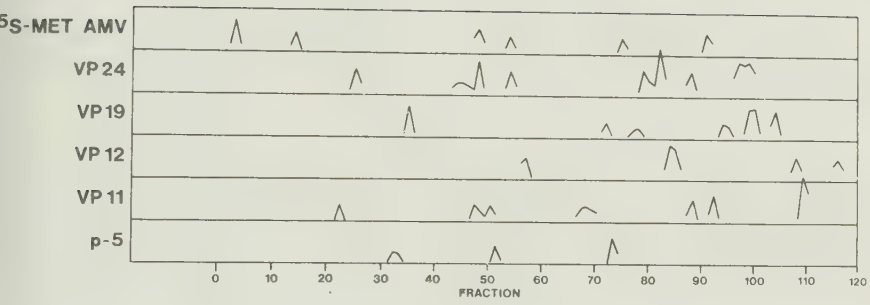


Abb. 22 : Darstellung der Peptidmuster der ^{3}H-Arg markierten Peptide aller gs-Proteine. Die Peptidmuster wurden einzig durch die Peptidfraktionen und nicht durch das vollständige Fraktionierungsmuster dargestellt. Als Beispiel wurde das vollständige Fraktionierungsmuster der markierten Peptide des VP-24 in Abb. 21 aufgezeichnet.

Ein Peptid des VP-24 und ein Peptid des VP-11 eluierten in der Fraktion 88 von der Säule. Die restlichen Peptide der verschiedenen gs-Proteine besassen untereinander keine gemeinsamen Auftrennungseigenschaften (siehe Text).

tryptischen Peptide des p-5-Proteins analysiert. Das p-5-Protein weist ein Molekulargewicht von 7'000 Dalton auf und konnte nur nach Auftrennung der Virus-Proteine durch Agarose-Gelfiltration nachgewiesen werden.

Die 5 gs-Virion-Proteine weisen untereinander keine ähnlichen Peptide auf. Eine Ausnahme bilden ein Peptid des VP-24 und ein Peptid des VP-11, die in der gleichen Fraktion aus der Säule eluierten. Die beiden Peptide wurden nicht weiter analysiert, jedoch kann nach einem Vergleich mit den Peptidmustern in den Abbildungen 23 und 24 gefolgert werden, dass das VP-24 und das VP-11 kein gemeinsames markiertes Peptid besitzen.

Durch die Kationenaustauscher-Säule konnten die markierten Peptide aller gs-Virion-Proteine aufgetrennt und eindeutig ausgewertet werden. Die gs-Proteine weisen untereinander keine markierten Peptide mit ähnlichen Auftrennungseigenschaften auf.

4.2.2. ^{14}C-Arginin/^{3}H-Arginin markierte Virion-Peptide

Die ^{3}H-Arg oder ^{14}C-Arg markierten gs-Virion-Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, vom Gel eluiert und nach Oxydation tryptisch gespalten. Das VP-12 und das VP-11 wurden zusammen vom Gel eluiert und tryptisch gespalten. Die ^{3}H-Arg markierten VP-24-Peptide und die ^{14}C-Arg markierten VP-12/11-Peptide wurden zusammengebracht und durch die Kationenaustauscher-Säule aufgetrennt (Abb. 23). Die gleiche Peptidauftrennung wurde mit ^{14}C-Arg markierten VP-24-Peptiden und ^{3}H-Arg markierten VP-12/11-Peptiden wiederholt (Abb. 24). Die Resultate zeigen die Reproduzierbarkeit der Methode. Ebenso konnte gezeigt werden, dass das Peptidmuster der Polyacrylamidgel-aufgetrennten Polypeptide vergleichbar ist mit dem Peptidmuster, das nach Auftrennung der gs-Proteine durch Agarose-Gelfiltration erhalten wurde. Die Auftrennung der Polypeptide durch SDS-PAGE oder durch Agarose-Gelfiltration hatte erwartungsgemäss keinen Einfluss auf die Peptidauftrennung.

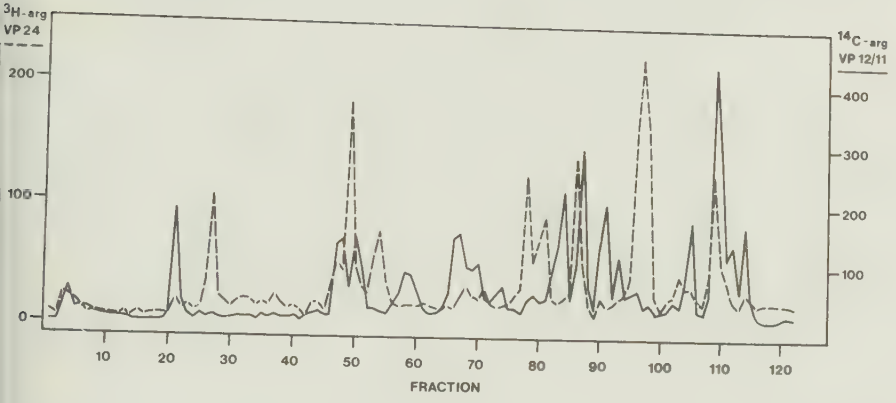


Abb. 23 : Die ^{3}H-Arg bzw. ^{14}C-Arg markierten gs-Virion-Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die tryptischen Peptide wurden durch die "Chromodead-P" Kationenaustauscher-Säule aufgetrennt (siehe Legende Abb. 21). Nach Auftrennung des ^{3}H-Arg VP-24- und ^{14}C-Arg VP-12/11-Peptidgemisches wurde das Fraktionierungsmuster dargestellt.

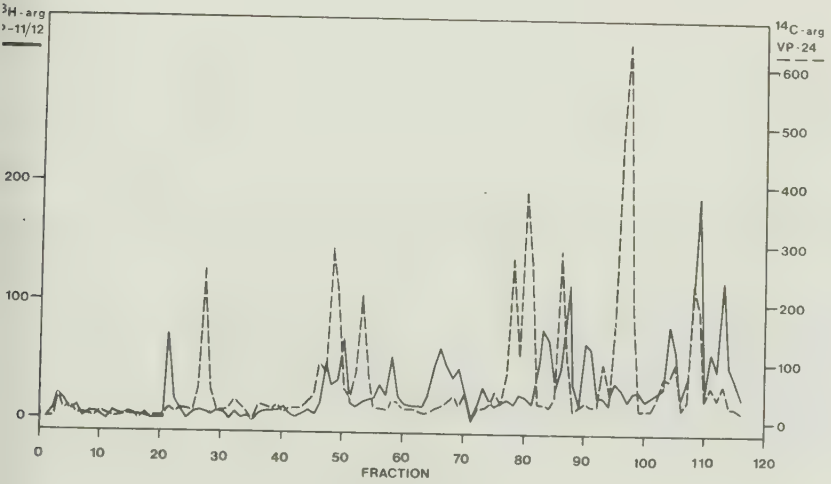


Abb. 24 : siehe Legende Abb. 23. Das Fraktionierungsmuster zeigt die aufgetrennten Peptide von ^{14}C-Arg VP-24 und ^{3}H-Arg VP-12/11.

4.2.3. Quantitative Arginin-Bestimmung durch "Chromobead-P" Ionenaustauscher-Säule

Die folgenden Berechnungen wurden mit den Zählraten, die im Versuch 4.2.2. (Abb. 23 und 24) erhalten wurden, durchgeführt:

Die Zählraten aller Fraktionen wurden nach Subtraktion der Background-Werte zusammengezählt und die Argininresten pro Polypeptid errechnet. Der prozentuale Anteil der Zählraten betrug ungefähr 5% pro Arginin beim VP-24 und ebenfalls ungefähr 5% pro Arginin beim VP-12/11. (Tab. 1)

Die Peptidfraktionen, bei denen ein mehrfaches von 5% der Gesamt-Zählraten eluiert wurden, enthalten eine entsprechende Anzahl Arginine. Die Peptide, die nach tryptischer Spaltung mehr als ein Arginin enthalten, können:

- das Produkt einer unvollständigen Enzymaktivität sein,
- die Sequenz -Arg-Pro- besitzen,
- Arg oder Lys am N-terminalen Ende besitzen,
- oder die eine und andere dieser Möglichkeiten treffen kombiniert zu.

Ebenso könnten mehrere verschiedene Peptide in der gleichen Fraktion aus der Säule eluiert werden.

Bei einem Vergleich des VP-12/11-Peptidmusters (Abb. 23 und 24) mit den markierten Peptiden des VP-12 und des VP-11 in Abb. 22 lassen sich die einzelnen Peptide des VP-12 und die Peptide des VP-11 bestimmen.

Pro VP-24-Molekül wurden 12-14 Arginine, pro VP-12-Molekül 4 Arginine und pro VP-11-Molekül 10 Arginine berechnet. In der Literatur wurde das VP-11 mit 7 Argininen und das VP-24 mit 12 Argininen beschrieben (Niall 1970). Bei der Sequenzanalyse des VP-11 wurden 9 Arginine bestimmt (Persönliche Mitteilung von Niall und Allen). A. Herman (Herman et al. 1975) konnte pro VP-24-Molekül 20 Arginine, pro VP-19-Molekül 9 Arginine, pro VP-12-Molekül 12 Arginine und pro VP-11-Molekül ebenfalls 12 Arginine nachweisen.

VP-24

^{14}C-Arg VP-24

Gesamt-Zahlrate: 7233 = 100 %

Fraktions-Nr.:	Zahlrate:	% der Gesamt-Zahlrate:	Anzahl ^{14}C-Arg:
25 - 29	385	5.3	1
45 - 51	813	11.2	2
51 - 55	438	6.0	1
76 - 79	499	6.8	1
79 - 82	690	9.5	2
84 - 88	476	6.5	1
94 - 99	1549	21.4	4
101 - 106	337	4.6	1
106 - 110	523	7.2	1
			14

VP-24

^{3}H-Arg VP-24

Gesamt-Zahlrate: 3812 = 100 %

Fraktions-Nr.:	Zahlrate:	% der Gesamt-Zahlrate:	Anzahl ^{3}H-Arg:
25 - 29	196	5.1	1
46 - 52	416	1o.9	2
52 - 56	214	5.6	1
76 - 79	236	6.2	1
79 - 82	236	6.2	1
84 - 88	261	6.8	1
94 - 100	661	17.3	3
100 - 107	212	5.5	1
107 - 113	318	8.3	1
			12

VP-12

^{14}C-Arg VP-12/11

Gesamt-Zahlrate (VP-12 + VP-11): 6529 = 100 %

Fraktions-Nr.:	Zahlrate:	% der Gesamt-Zahlrate:	Anzahl ^{14}C-Arg:
55 - 62	361	5.5	1
80 - 85	551	8.4	1
103 - 106	315	4.8	1
113 - 116	291	4.5	1
			4

VP-12

^{3}H-Arg VP-12/11

Gesamt-Zahlrate (VP-12 + VP-11): 2935 = 100 %

Fraktions-Nr.:	Zahlrate:	% der Gesamt-Zahlrate:	Anzahl ^{3}H-Arg:
56 - 60	141	4.8	1
81 - 85	229	7.8	1
102 - 106	215	7.3	1
112 - 116	267	9.0	1
			4

VP-11

20 - 24	264	4.0	1
46 - 49	352	5.4	1
49 - 52	326	5.0	1
64 - 72	751	11.5	2
85 - 89	536	8.2	1
89 - 92	417	6.3	1
107 - 112	1125	17.2	3
			10

VP-11

20 - 24	97	3.3	1
45 - 48	96	3.3	1
48 - 52	159	5.4	1
62 - 71	308	10.5	2
85 - 89	206	7.0	1
89 - 94	201	6.8	1
106 - 111	442	15.1	3
			10

Tabelle 1 : Nach der Auftrennung der Peptide durch die "Chromobead-P" Kationenaustauscher-Säule wurden die ^{3}H-Arg bzw. ^{14}C-Arg Zählraten aller Fraktionen addiert. Anschliessend wurde der prozentuale Anteil der Zählraten pro Arginin berechnet (Abb. 23 und 24). Er betrug ungefähr 5% pro Arginin beim VP-24 und ebenfalls ungefähr 5% pro Arginin beim VP-12/11. Pro VP-24-Molekül wurden 12-14 Arginine, pro VP-12-Molekül 4 Arginine und pro VP-11-Molekül 10 Arginine berechnet. Die Peptide des VP-12 und die Peptide des VP-11 konnten nach einem Vergleich mit der Abb. 22 aus dem VP-12/11-Gemisch bestimmt werden.

5. Diskussion

Die gruppenspezifischen (gs)-Proteine des Hühner-Leukose-Virus (AMV) wurden mit ^{35}S-Methionin markiert und durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese oder durch Agarose-Gelfiltration aufgetrennt. Die aufgetrennten Polypeptide wurden oxydiert und mit Trypsin gespalten. Die Peptide wurden durch Elektrophorese und Chromatographie zweidimensional aufgetrennt. Die markierten Peptide wurden durch Autoradiographie nachgewiesen.

Die Grösse und die radioaktive Intensität der Peptidflecken waren unterschiedlich. Trotz diesen quantitativen Unterschieden wurden sämtliche Peptidflecken, ohne Berücksichtigung der Intensitäten, ausgewertet. Ein Vergleich der Peptidmuster aller gs-Virion-Proteine zeigt (Abb. 8), dass das virale Vorläufer-Protein überlappend gespalten würde. Dies würde bedeuten, dass mehrere Moleküle des Vorläufer-Proteins durch proteolytische Enzyme verschieden gespalten werden. Ein derartiger Spaltungsprozess konnte bis anhin nicht nachgewiesen werden. Bei der Auswertung sämtlicher Peptidflecken wurden auch die schwach markierten Peptide berücksichtigt. Aus stöchiometrischen Gründen ist es jedoch nicht möglich, dass einzelne Peptide eines Polypeptids mehr als zehnmal höhere Radioaktivitäten aufweisen als andere Peptide der gleichen Polypeptidkette. Die schwach markierten Peptide könnten i) Peptide eines Polypeptids sein, das während der SDS-PAGE die viralen Polypeptide kontaminierte, ii) eine Degradation der markierten Peptide während der Aufarbeitung der Probe sein, iii) das Produkt einer schwachen, nicht tryptischen Protease-Aktivität sein. Deshalb wurden von den gleichen Autoradiogrammen einzig die stark markierten Peptide ausgewertet. Beim Vergleich der Peptidmuster aller gs-Virion-Proteine nach der Auswertung der starken Peptidflecken (Abb. 14), besassen die verschiedenen gs-Proteine untereinander keine gemeinsamen Peptide mehr. Eine Ausnahme bildete ein Peptid des VP-19, das eine ähnliche Mobilitätseigenschaft mit einem Peptid des VP-12 besass. Die beiden gemeinsamen Peptide des VP-12 und des VP-11 könnten durch die ungenügende Auftrennung der beiden Polypeptide durch SDS-PAGE erklärt werden. Da die Peptidmuster, die nach Markierung der gs-Proteine mit ^{35}S-Met erhalten wurden, zu wenig Information enthielten, um eine endgültige Antwort auf die Frage des Spaltungsprozesses

am viralen Vorläufer-Protein zu geben, wurden die viralen Proteine mit ^{14}C-Arginin markiert. Dabei sollten ungefähr die Hälfte aller tryptischen Peptide markiert sein. Das daraus resultierende Peptid-Modell der gs-Virion-Proteine (Abb. 20) zeigt die Aehnlichkeit mit dem Peptid-Modell, das nach der Auswertung der starken Peptidflecken der ^{35}S-Methionin markierten gs-Proteine erhalten wurde. Eine teilweise Ueberlappung des VP-24 mit dem VP-12 und dem VP-11 wurde postuliert. Das VP-19 überlappte mit keinem andern gs-Polypeptid. Die Ueberlappung des VP-12 mit dem VP-11 könnte wiederum in der ungenügenden Auftrennung der beiden Polypeptide durch SDS-PAGE gründen. Bei der Auswertung der starken Peptidflecken auf den Autoradiogrammen wurde die Grenze zwischen starken und schwachen Peptidflecken willkürlich gewählt. Um die starken und die schwachen Peptidflecken klar zu bezeichnen, wurden im Folgenden die Peptide eindimensional durch eine Kationenaustauscher-Säule aufgetrennt und die Radioaktivitäten aller Fraktionen gezählt. Besondere Vorteile der Peptidauftrennung durch die Kationenaustauscher-Säule bestanden in der Möglichkeit, Peptidkarten von verschieden markierten Polypeptiden zu erstellen und die Anzahl der markierten Aminosäuren pro Polypeptid zu berechnen. Durch die Markierung der gs-Proteine mit verschiedenen Aminosäuren und durch die Auftrennung der Peptide durch 2 verschiedene Methoden konnte der Schluss gezogen werden, dass das virale Vorläufer-Protein nicht überlappend, sondern in Serie gespalten wird.

Die Interpretation der zweidimensional aufgetrennten Peptidmuster ist schwierig. Ein Beispiel aus der Literatur zeigt, dass bei der Darstellung der Peptidmuster der Kapsidproteine des Polyoma-Virus von zwei Autoren zwei unterschiedliche Resultate erhalten wurden. T. Friedman (Friedman 1974) zog nach zweidimensionaler Auftrennung der tryptischen Peptide durch Elektrophorese und Chromatographie den Schluss, dass das Haupt-Kapsidprotein und die Neben-Kapsidproteine des Polyoma-Virus grösstenteils gemeinsame Peptide untereinander aufweisen und daher von einem gemeinsamen Vorläufer-Protein, das überlappend gespalten würde, herstammen. G. Fey (Fey 1974) zeigte in einer modifizierten Methode der zweidimensionalen Peptidauftrennung, dass das Haupt-Kapsidprotein und ein Neben-Kapsidprotein einige gemeinsame Peptide aufweisen könnten, grösstenteils jedoch zwei verschiedene Proteine sind. Durch die Auftrennung der Peptide durch die Kationenaustauscher-Säule konnte G. Fey zeigen, dass

das Haupt- und das Neben-Kapsidprotein keine ähnlichen Peptide besitzen. Die Gegenüberstellung dieser beiden Schlüsse zeigt, dass die zweidimensionale Peptidauftrennung durch Elektrophorese und Chromatographie ungenügend ist, um endgültige Aussagen zu postulieren.

Die Auftrennung der tryptischen Peptide durch die "Chromobead-P" Kationenaustauscher-Säule erlaubte eine eindeutige Auswertung der Daten, da die Radioaktivitäten der einzelnen Fraktionen gezählt werden konnten. Für das Hühner-Leukose-Virus wurde nachgewiesen, dass die 4 gs-Proteine keine gemeinsamen Aminosäurensequenzen untereinander aufweisen und 4 verschiedene Polypeptide sind.

Die dargestellten Resultate der durch Elektrophorese und Chromatographie zweidimensional aufgetrennten Peptide oder durch Kationenaustauscher-Säule eindimensional aufgetrennten Peptide konnten in mehreren unabhängigen Versuchen wiederholt werden. Wurde ein bestimmtes Polypeptid durch SDS-PAGE oder durch Agarose-Gelfiltration aufgetrennt, so konnten erwartungsgemäss keine unterschiedlichen Peptidmuster nach Auftrennung der tryptischen Peptide durch die Kationenaustauscher-Säule nachgewiesen werden.

Nach der Auftrennung der mit Arginin markierten Peptide durch die Kationenaustauscher-Säule bestand die Möglichkeit, die Anzahl der markierten Arginine pro Polypeptid zu berechnen. Für das VP-24-Polypeptid wurden 12-14 Arginine, für das VP-12-Polypeptid 4 Arginine und für das VP-11-Polypeptid 10 Arginine berechnet.

6. Zusammenfassung

Die gruppenspezifischen (gs)-Proteine von Hühner-Leukose-Viren (AMV) wurden mit ^{35}S-Methionin markiert und durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese oder durch Agarose-Gelfiltration aufgetrennt. Die aufgetrennten Polypeptide wurden oxydiert und tryptisch gespalten. Die Peptide wurden zweidimensional durch Elektrophorese und Chromatographie aufgetrennt.

Nach der Autoradiographie konnten verschieden grosse und verschieden stark radioaktiv markierte Peptidflecken nachgewiesen werden. Bei der Auswertung sämtlicher Peptidflecken konnte nach dem Vergleich der Peptidmuster aller gs-Proteine ein Modell dargestellt werden (Abb. 8), das auf eine überlappende Spaltung der viralen Vorläufer-Proteine hinweisen würde. Ein derartiger Spaltungsprozess bei Proteinen konnte bis anhin nicht gezeigt werden. Aus stöchiometrischen Gründen ist es nicht möglich, dass einzelne Peptide eines Polypeptids mehr als zehnmal höhere Radioaktivitäten aufweisen als andere Peptide der gleichen Polypeptidkette. Deshalb wurden von den gleichen Autoradiogrammen einzig die stark markierten Peptide ausgewertet. Beim Vergleich der Peptidmuster aller gs-Proteine nach der Auswertung der starken Peptid-Flecken konnte ein Modell dargestellt werden (Abb. 14), das keine überlappenden gs-Proteine zeigte. Eine Ausnahme bildete ein Peptid des VP-19 und ein Peptid des VP-12, die gemeinsame Mobilitätseigenschaften aufwiesen. Die einfachen Peptidmuster, die mit ^{35}S-Met markierten Polypeptiden erhalten wurden, besassen zuwenig Information, um endgültige Schlüsse zu ziehen. Deshalb wurden die viralen Polypeptide mit ^{14}C-Arginin markiert. Die Peptidmuster der stark markierten tryptischen Peptide aller gs-Proteine zeigten ein ähnliches Modell (Abb. 20), wie es nach der Auswertung der stark markierten Peptide der ^{35}S-Met markierten Polypeptide erhalten wurde. Die Grenzen zwischen stark markierten und schwach markierten Peptiden wurde willkürlich gewählt. Um diese Werte klar zu bestimmen, wurden die Peptide die "Chromobead-P" Kationenaustauscher-Säule fraktioniert und die Radioaktivitäten aller Fraktionen gezählt. Die Peptidmuster aller gs-Proteine wurden wiederum ausgewertet und es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen gs-Proteine untereinander keine gemeinsamen Peptide aufweisen (Abb. 22).

Nach der Auftrennung der markierten Peptide durch die Ionenaustauscher-

Säule bestand die Möglichkeit, die Anzahl der markierten Arginine pro Polypeptid zu berechnen. Für das VP-24-Polypeptid wurden 12-14 Arginine, für das VP-12-Polypeptid 4 Arginine und für das VP-11-Polypeptid 10 Arginine berechnet.

Résumé

Les protéines spécifiques de group (gs-protéines) du virus de la myéloblastose aviaire (AMV) marquées à la ^{35}S-methionine ont été séparées par électrophorèse en gel de SDS-polyacrylamide ou filtration en gel d'agarose. Après digestion tryptique des polypeptides marqués, les peptides ont été séparés sur couche mince de cellulose en deux dimensions par électrophorèse et chromatographie.

Après autoradiographie, il est possible de mettre en évidence les peptides sous forme de taches de taille et d'intensité radioactive différentes. L'analyse de toutes les taches visibles conduit à un modèle de constitution en peptides des gs-protéines (Fig. 8). Par ce modèle, certains peptides seraient communs à plusieurs gs-protéines, suggérent une scission du précurseur polypeptidique en fragments se recouvrant. Toutefois, un tel mode de scission n'a jamais été observé pour des autres protéines. En plus, stoichiométriquement, il est impossible que certains peptides d'une protéine puissent contenir une quantité dix fois supérieure de radioactivité que d'autres peptides de la même protéine. Pour ces deux raisons, seules les taches les plus sombres ont été analysées. Cette analyse montre que chaque gs-protéine est distincte (Fig. 14). Une exception toutefois, un des peptides de la protéine virale-19 (VP-19) a une mobilité semblable à un peptide de VP-12. Le faible nombre de peptides marqués au ^{35}S-methionine par protéine ne permet pas de donner une conclusion définitive sur le mode de scission du précurseur polypeptidique. Pour obtenir des informations additionnelles, les protéines virales ont été marquées avec de ^{14}C-arginine. L'analyse des peptides de ces protéines par électrophorèse et chromatographie conduit à un modèle (Fig. 20) semblable à celui établi avec les protéines marquées au ^{35}S-methionine. La limite entre tache foncée et tache claire est arbitraire. Pour différencier les

peptides hautement et faiblement radioactifs, ceux-ci ont été fractionnés sur colonne échangeuse de cation ("Chromobead-P") et la radioactivité sortante a été mesurée par fraction. Il est possible de montrer par cette méthode que les gs-protéines n'ont pas de peptides en commun (Fig. 22).

Apres séparation des peptides sur colonne échangeuse de cation, le nombre d'arginines par polypeptide peut être déterminé. VP-24 contient 12-14 arginines; VP-12 4 arginines et VP-11 10 arginines.

Summary

^{35}S-methionine labelled group specific (gs)-proteins of avian myeloblastosis virus (AMV) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis or by gel filtration. After tryptic digestion of the labelled polypeptides, the peptides were separated in two dimensions by electrophoresis and chromatography.

After autoradiography, peptide spots of different size and radioactive intensity were found. The analysis of faint and dark peptide spots lead to a fingerprint model of all gs-proteins (Fig. 8) which would indicate overlapping cleavage of the viral precursor-proteins into gs-proteins. Such a cleavage has never been shown for other proteins. For stoichiometric reasons it is impossible that some peptides of a polypeptide could contain more than ten times higher radioactivity than other peptides of the same polypeptide. For this reason only the dark peptide spots were analysed. After comparison of the fingerprints of the different gs-proteins a peptide model resulted (Fig. 14) which shows discrete gs-proteins. An exception was one peptide from VP-19 which had the same mobility as one peptide from VP-12. The simple fingerprints with ^{35}S-met labelled polypeptides were not sufficient to give an absolute statement about the cleavage of the viral precursor-protein. To obtain additional information the viral polypeptides were labelled with ^{14}C-arginine. The fingerprint model derived from the analysis of the dark spots was similar to the model obtained with ^{35}S-met labelled polypeptides. The limits between dark and faint spots on autoradiography were arbitrary. In order to better define the strongly and weakly labelled peptides,

peptides were fractionated by cation exchange column ("chromobead-P") and the radioactivity of each fraction was counted. The fingerprint model of all gs-proteins obtained in this way shows that the different gs-proteins have no commun peptides (Fig. 22).

After peptide separation on a cation exchange column the number of arginine residues per polypeptide could be determined. The VP-24-polypeptide contains 12-14 arginines, the VP-12-polypeptide 4 arginines and the VP-11-polypeptide 10 arginines.

IV. Versuche in vitro zur Spaltung von Hühner-Leukose-Virus Vorläufer-Proteinen in gruppenspezifische Virion-Proteine

7. Problemstellung

Die gruppenspezifischen (gs)-Proteine von Hühner-Leukose-Viren (AMV) werden in virusinfizierten Hühner-Fibroblasten-Kulturen als hochmolekulare Vorläufer-Proteine synthetisiert. Das längste isolierte Vorläufer-Protein weist ein Molekulargewicht von 76'000 Dalton auf. Das Molekül wird stufenweise zu niedermolekularen Vorläufer-Proteinen und schliesslich zu gs-Virion-Proteinen von 24'000, 19'000, 12'000 und 11'000 Dalton Molekulargewicht gespalten (Vogt und Eisenmann 1973).

Die unter in vivo Bedingungen in den Zellkulturen nachweisbare Spaltung des viralen Vorläufer-Proteins in gs-Virion-Proteine lässt keine direkte Folgerung auf die Natur des spezifischen Spaltmechanismus zu, da die Reaktion in einer auf molekularer Stufe unbekannten und komplexen Umgebung abläuft. Deshalb wurde versucht, das mit ^{35}S-Met markierte Vorläufer-Protein aus dem Zellextrakt zu isolieren und mit Lysaten der Wirtszellen oder mit gereinigten AMV-Partikeln oder mit verschiedenen Virus-Fraktionen zu inkubieren. Eine mögliche, spezifische Spaltung des viralen Vorläufer-Proteins könnte dadurch in vitro in einem bekannten Reaktionsgemisch nachgewiesen werden. Nach der Inkubation wurden die immunpräzipitierten Virus-Proteine durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert.

Während der Inkubation eines Lysats von virusinfizierten Zellen wurde ein Teil der im Lysat vorhandenen viralen Vorläufer-Polypeptide in gs-Virion-Polypeptide gespalten (Vogt V. et al.). Nach der Zerstörung der Zellmembranen mit Detergentien oder Chloroform wurden die viralen Vorläufer-Polypeptide nicht mehr gespalten. Obwohl durch diese Versuche gezeigt werden konnte, dass die Zellmembranen möglicherweise für die Spaltung des hochmolekularen Vorläufers verantwortlich sind, ist bis anhin nicht bekannt, welche Bedeutung den Zellmembranen für die proteolytische Spaltung der Virusproteine zukommt. Aus diesem Grunde wurde die Beziehung der viralen und zellulären Proteine zur Zellmembran untersucht.

8. Isolierung von viralen Vorläufer-Polypeptiden

Um die proteolytische Spaltung der viralen Vorläufer-Polypeptide in niedermolekulare gs-Virion-Polypeptide in vitro zu studieren, musste das Polypeptid aus dem Zell-Lysat isoliert werden. AMV-infizierte Zellen wurden mit ^{35}S-Met markiert und anschliessend mit Detergentien oder mechanisch lysiert. Die Virusproteine wurden mit Immunserum gegen detergentienlysierte AMV-Partikel, das aus immunisierten Kaninchen gewonnen wurde, aus dem Zellextrakt präzipitiert. Eine Immunpräzipitation war nötig, da während einer 30 Minuten Markierung der virusinfizierten Zellen mit ^{35}S-Met nur ungefähr 1% - 2% aller markierten Proteine Virusproteine sind. Wurden die virusinfizierten Zellen während 10 Minuten mit ^{35}S-Met bei 37^{o} C inkubiert, so konnten einzig die viralen Vorläufer-Polypeptide im Immunpräzipitat als markierte, virusspezifische Antigene nachgewiesen werden. Während der folgenden Nachinkubation der markierten Zellen mit Normalmedium wurden die markierten, viralen Vorläufer-Polypeptide in gs-Virion-Polypeptide gespalten. Nach der Immunpräzipitation des Zellextrakts konnten dabei die markierten gs-Virion-Antigene nachgewiesen werden.

8.1. Versuche zur Anreicherung von viralen Vorläufer-Polypeptiden in virusinfizierten Zellkulturen

Bei einer Inhibition der Protease-Aktivität in den virusinfizierten Zellen könnten die viralen Vorläufer-Polypeptide möglicherweise während längerer Markierungszeit synthetisiert, jedoch nicht zu gs-Virion-Proteinen gespalten werden. Eine Anreicherung von viralen Vorläufer-Proteinen in den Zellen wäre für die nachfolgende Isolierung der Polypeptide aus dem Zellextrakt vorteilhaft. Des weitern könnten bei Verwendung von spezifischen Protease -Inhibitoren Rückschlüsse auf die Protease-Aktivität gezogen werden.

8.1.1. Behandlung der virusinfizierten Zellkulturen mit Diisopropylfluorophosphat

Diisopropylfluorophosphat (DFP) oder Nervengas ist ein Serin-Protease-Hemmer. Der Inhibitor reagiert mit einem Serinrest der biologisch aktiven Gruppe der Protease und hemmt dadurch die Hydrolase-Aktivität des Enzyms (Perlmann 1970).

Die ^{35}S-Met markierten, immunpräzipitierten Polypeptide wurden nach SDS-PAGE durch Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 25). Die viralen Vorläufer-Polypeptide von 76'000 Dalton Molekulargewicht wurden trotz Anwesenheit von DFP in den Zellkulturen zu niedermolekularen gs-Virion-Proteinen gespalten. DFP hemmt die Proteasenaktivität am viralen Vorläufer-Polypeptid nicht.

8.1.2. Behandlung der virusinfizierten Zellkulturen mit Pentamidin-Isäthiomat

Pentamidin-Isäthiomat (PI) wirkt ähnlich wie DFP als Inhibitor der Serin-Proteasen (Prouty 1972).

Die intrazelluläre Protease-Aktivität konnte, ähnlich dem DFP-Versuch, nicht blockiert werden (Abb. 26). In Gegenwart von 10^{-3} M PI wurde die Proteinsynthese in den Zellen nach 5 Minuten Vorinkubation mit PI stark verlangsamt und nach 15 Minuten Vorinkubation mit 10^{-3} M PI war in den Zellen keine Proteinsynthese mehr nachweisbar.

Weder DFP, noch PI als Protease -Inhibitoren können die Spaltreaktion von viralen Vorläufer-Proteinen in gs-Virion-Proteine blockieren. Das intrazelluläre Spaltenzym ist demzufolge keine Serin-Protease. Andere Proteasen-Hemmer wie der Chymotrypsin-Inhibitor TPCK (L-1-Tosylamid-2-Phenyläthylchloromethyl Keton) oder der Trypsin-Inhibitor TLCK (Tosyl-Lysin-Chloromethyl Keton) haben ebenfalls keinen Einfluss auf die Enzym-Aktivität (Vogt V. et al.).

8.2. Isolierung der viralen Vorläufer-Polypeptide aus dem Lysat von virusinfizierten Zellen

8.2.1. Fraktionierung des Zellhomogenats durch einen exponentiellen Saccharose-Gradienten

Die während 10 Minuten markierten, AMV-infizierten Zellen einer Gewebekulturschale wurden in hypertonischem RSB 20 Minuten auf Eis stehen gelassen und die von der Haftfläche der Schale mechanisch abgelösten Zellen in einem Dounce-Homogenisator Typ B homogenisiert. Die Zellkerne wurden bei 700 x g

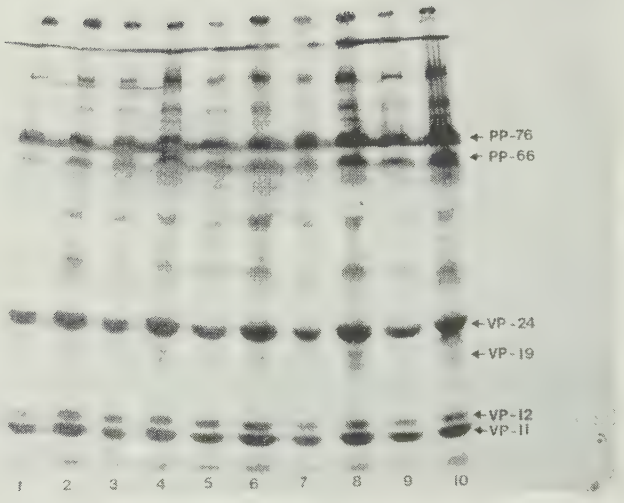


Abb. 25 : Behandlung der virusinfizierten Zellkulturen mit Diisopropyl-Fluorophosphat (DFP).

Probe Nr.	DFP (mM)	Vorinkubation mit DFP (Min)	Dauer der ^{35}S-Met Markierung (Min)	Nachinkubation mit Normal-Medium (Min)
1	-	-	10' (-DFP)	30' (-DFP)
2	-	-	30' (-DFP)	30' (-DFP)
3	1	10'	10'	30'
4	1	10'	30'	30'
5	1	30'	10'	30'
6	1	30'	30'	30'
7	10	10'	10'	30'
8	10	10'	30'	30'
9	10	30'	10'	30'
10	10	30'	30'	30'

Anschliessend an die Nachinkubation der Zellkulturen mit Normalmedium wurden die Zellen mit 0.5% DOC und 0.5% NP-40 lysiert. Die Virus-Proteine wurden mit Kaninchen-Immunserum gegen AMV-Proteine aus dem kernfreien Zell-Lysat präzipitiert. Der Immunkomplex wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und die markierten Polypeptide durch Autoradiographie nachgewiesen.

PP ist die Abkürzung für das virale Vorläufer-Protein und VP bedeutet gs-Virion-Proteine. Die nachstehenden Zahlen bezeichnen das Molekular-Gewicht x 10^{-3}.

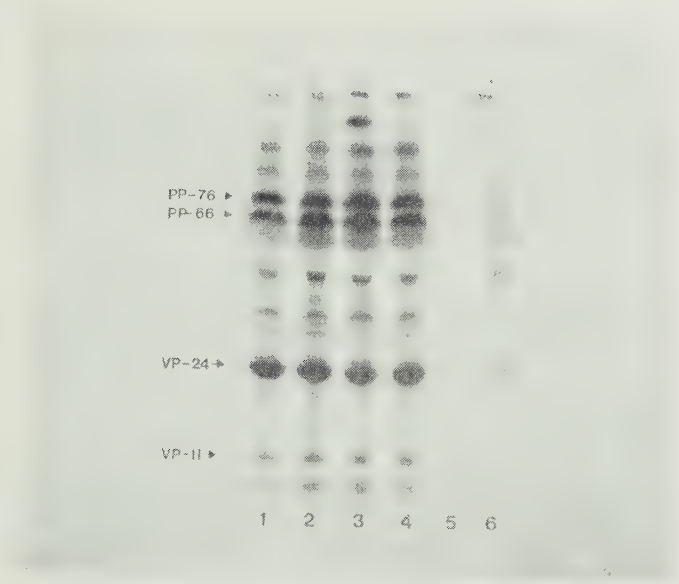


Abb. 26 : Behandlung der virusinfizierten Zellkulturen mit Pentamidin-Isäthiomat (PI).

Probe Nr.	PI (mM)	Vorinkubation mit PI (Min)	Dauer der ^{35}S-Met Markierung (Min)	Nachinkubation mit Normalmedium (Min)
1	-	-	30' (-PI)	30' (-PI)
2	10^{-7}	15'	30'	30'
3	10^{-5}	15'	30'	30'
4	10^{-5}	5'	30'	30'
5	10^{-3}	15'	30'	30'
6	10^{-3}	5'	30'	30'

Die Virus-Proteine wurden anschliessend an die Nachinkubation aus dem Zell-Lysat immunpräzipitiert. (siehe Legende zur Abb. 25).
Zwischen dem 15% Laufgel und dem darübergeschichteten 5% PAG konnte auf dem Autoradiogramm bei der Probe 3 ein markiertes Polypeptid nachgewiesen werden. Möglicherweise handelt es sich um ein Aggregat von Polypeptiden.

sedimentiert, zweimal in RSB suspendiert, wiederum homogenisiert und zentrifugiert. Das kernfreie Zell-Lysat wurde auf einen 16% - 60% exponentiellen Saccharose-Gradienten überschichtet.

Zur Herstellung des exponentiellen Saccharose-Gradienten wurde 1 Volumen konstant gehalten. Dieses Volumen enthielt zu Beginn der Gradientenmischung 60% Saccharose in RSB. Die 60% Saccharose-Lösung wurde während der Gradientenherstellung mit 1 Volumen 16% Saccharose in RSB verdünnt.

Das Zell-Lysat wurde durch den exponentiellen Gradienten im SW-27-Rotor während 20 Stunden bei 90'000 x g und 4^{o} C aufgetrennt. Anschliessend an die Zentrifugation wurde der Gradient in 45 Fraktionen eingesammelt, und von jeder Fraktion wurde eine Probe zur Radioaktivitäts-Bestimmung entnommen. In Abb. 27 wurde das Fraktionierungsmuster des markierten Zell-Lysats graphisch dargestellt. Die Fraktionen der einzelnen Banden des Lysats wurden zusammengebracht, gegen Tris-NaCl-Puffer dialysiert und anschliessend immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate der Banden A-E wurden durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 28). Die viralen Vorläufer-Polypeptide konnten in den Banden B,C und D und vermindert in der Bande E nachgewiesen werden. Das Vorläufer-Protein ist in mehreren Gradientenfraktionen lokalisiert.

8.2.2. Ammoniumsulfat-Präzipitation des Lysats von virusinfizierten Zellen

AMV-infizierte Hühner-Fibroblasten wurden während 30 Minuten mit ^{35}S-Met in Earle's Salzlösung markiert, die Zellschicht mit kaltem PBS gewaschen und mit Tris-NaCl-Detergentien-Puffer lysiert. Nach Zentrifugation des Lysats bei 10'000 UPM in der Sorvall-RC-2B-Zentrifuge wurden 3 ml des Ueberstandes für die Ammoniumsulfat-Präzipitation und 1.7 ml des Ueberstandes für die in 8.2.3. beschriebene DEAE-Säulenchromatographie verwendet.

Das kernfreie Zell-Lysat wurde stufenweise durch Zugabe von kristallinem Ammoniumsulfat präzipitiert:

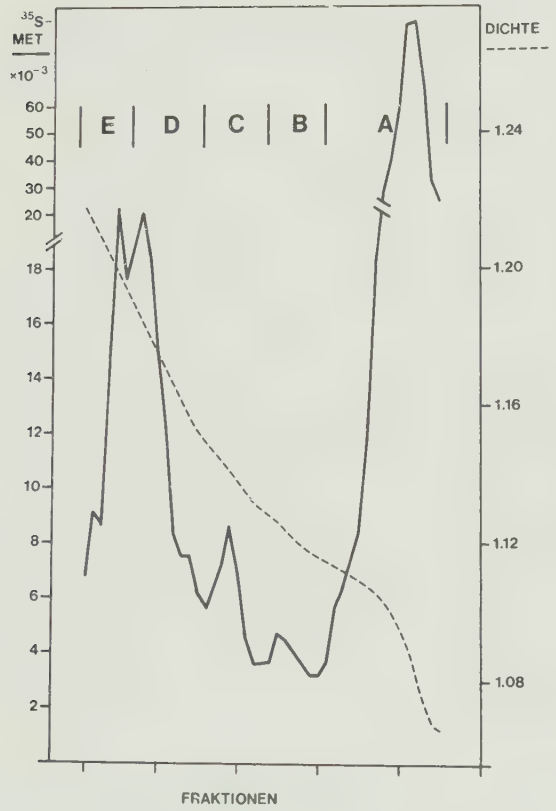


Abb. 27 : Auftrennung des kernfreien Lysats von AMV-infizierten Hühner-Fibroblasten durch einen 16% - 60% Saccharose-Gradienten. Das Lysat wurde während 20 Stunden bei 22'000 UPM im SW-27-Rotor bei 4^{0} C zentrifugiert.

Abb. 28 : Autoradiographie der ^{35}S-Met markierten viralen Polypeptide. Die viralen Polypeptide wurden aus den Fraktionen der Banden A-E (Abb. 27) immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert.

Ü = Ueberstand des Zellhomogenats nach der Sedimentation der Zellkerne.

% $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung	Volumen der Probe (ml)	Zugabe von kristallinem $(NH_4)_2SO_4$ (g/ml)	g total
0 - 30 %	3	0.175	0.525
30 - 40 %	3	0.061	0.183
40 - 45 %	3	0.031	0.093
45 - 50 %	3	0.031	0.093
50 - 55 %	3	0.032	0.096
55 - 65 %	3	0.064	0.192
65 -100 %	3	0.267	0.801

Bei jeder Ammoniumsulfat-Konzentration wurde das kristalline Ammoniumsulfat während 2 Stunden in Eiswasser mit dem Magnetrührer gelöst. Die bei den verschiedenen Ammoniumsulfat-Konzentrationen auspräzipitierten Polypeptide wurden bei 4'000 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Polypeptide wurden in Tris-NaCl-Puffer suspendiert und gegen den gleichen Puffer dialysiert, um die Ammoniumsulfat-Resten aus der Suspension herauszulösen. Anschliessend wurden die viralen Polypeptide aus der Suspension immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE analysiert.

Die viralen Vorläufer-Polypeptide präzipitierten bei Ammonium-Sulfat-Konzentrationen zwischen 40% und 65% Sättigung. Bei den verschiedenen Proben ist der bedeutendste Anteil der markierten Polypeptide nicht immunpräzipitierbar und daher virusunspezifisch. (Die Resultate dieses Versuches wurden nicht abgebildet).

8.2.3. DEAE-52 Säulenchromatographie des Lysats von virusinfizierten Zellen

1.7 ml des in 8.2.2. beschriebenen, kernfreien Zell-Lysats wurden durch DEAE-52 Säulenchromatographie aufgetrennt. Das DEAE-Säulenvolumen betrug 1 ml, was einer Adsorptionskapazität von ungefähr 50 mg Protein entspricht. Die Säule wurde mit dem Zell-Lysat in Tris-NaCl-Puffer, enthaltend 0.5% NP-40, beladen und der Säulendurchlauf in Fraktion 1 betrug 1.3 ml. Die an die DEAE-Partikel adsorbierten Polypeptide wurden mit einem linearen Salzgradienten von 0.05 M - 0.5 M NaCl im 20 mM Tris pH 7.5 und 0.5% NP-40 eluiert. Das totale Elutionsvolumen betrug 7.3 ml.

Die viralen Vorläufer-Polypeptide von 76'000 Dalton Molekular-Gewicht wurden von 0.05 M bis ungefähr 0.4 M NaCl von der Säule eluiert. Aehnlich eluierten die viralen Vorläufer-Polypeptide von 66'000 Dalton

Molekulargewicht und die gs-Virion-Polypeptide über mehrere Fraktionen des linearen Salzgradienten (Abb. 29).

Die DEAE-Säulenchromatographie war für die Isolierung der viralen Vorläufer-Polypeptide eine ungenügende Methode, da die viralen Polypeptide über mehrere Fraktionen verteilt aufgetrennt wurden und da diese Fraktionen zudem den Grossteil der zellulären Polypeptide enthielten.

8.2.4. Sephadex - G 100 Säulenchromatographie des dissoziierten Immunkomplexes

Bei einer Sephadex - G 100 Säulenchromatographie durchlaufen die globulären Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 150'000 Dalton die Säule im ausgeschlossenen Volumen, währenddem die kleineren Moleküle durch den Eintritt in die vernetzten Polysaccharid-Partikel zurückgehalten werden (Pharmacia). Die γGlobuline der Antikörper weisen ein Molekulargewicht von 160'000 Dalton auf, die viralen Vorläufer-Proteine 76'000 Dalton. Die viralen Proteine und die γGlobuline sollten daher nach Dissoziation des Immunkomplexes durch Sephadex - G 100 Säulenchromatographie aufgetrennt werden können.

Das Lysat von ^{35}S-Met markierten, virusinfizierten Zellen wurde mit Kaninchen-Antiserum immunpräzipitiert und der gewaschene Immunkomplex mit 0.1 M Glyzin pH 2.2 (Williams 1968) dissoziiert.

Die in Wasser gequollenen Sephadex-Partikel wurden in eine Säule von 0.6 cm Innendurchmesser gepackt. Die Höhe der Sephadex-Säule betrug 60 cm und die Durchflussgeschwindigkeit 3 ml pro Stunde. Die gepackte Säule wurde mit 0.1 M Glyzin pH 2.2 äquilibriert und anschliessend das dissoziierte Immunpräzipitat auf die Säule aufgetragen. Die Polypeptide wurden mit Glyzin-Puffer durch die Säule fraktioniert und in 60 Fraktionen von je 0.36 ml Volumen gesammelt. Jeder Fraktion wurde eine Probe entnommen und deren Radioaktivität gezählt.

Die markierten Polypeptide eluierten in den Fraktionen 17-18-19. Die Fraktionen 1 - 16, sowie die Fraktionen 17 - 19 wurden zusammengebracht, säurepräzipitiert und das Präzipitat durch SDS-PAGE analysiert. Nach Coomassie-Brillant-Blau-Färbung des Gels und nach dem Nachweis der radioaktiv markierten Polypeptide durch Autoradiographie zeigte sich, dass sowohl die γGlobuline, als auch die viralen Vorläufer-Polypeptide in den Fraktionen 17 - 19 von der

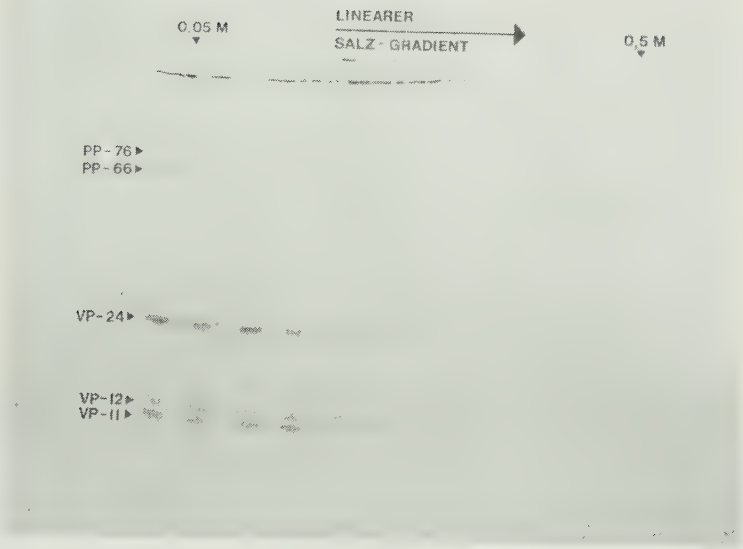


Abb. 29 : Autoradiogramm der durch DEAE-Säulenchromatographie aufgetrennten viralen Polypeptide.
Das ^{35}S-Met markierte Lysat von virusinfizierten Zellen wurde durch die DEAE-52 Ionenaustauscher-Säule mit einem linearen Salzgradienten von 0.05 M bis 0.5 M NaCl in 20 mM Tris pH 7.5 und 0.5% NP-40 aufgetrennt. Die viralen Polypeptide wurden aus den eingesammelten Fraktionen immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographiert.

Säule eluierten. In den Fraktionen 1 - 16 waren weder γGlobuline, noch markierte Polypeptide nachweisbar. Die γGlobuline und die viralen Vorläufer-Polypeptide liessen sich nach Dissoziation des Immunkomplexes nicht durch Sephadex - G 100 Säulenchromatographie auftrennen. Dieselben Resultate wurden nach Zugabe von 1 M NaCl oder 1% SDS zum Glyzin-Dissoziierungs-Puffer erhalten.

Bei der Verwendung von Sepharose 4B anstelle von Sephadex - G 100 und 6 M Guanidin-HCl pH 6.5 als Dissoziierungs-Puffer wurden die markierten Polypeptide und die γGlobuline durch den Eintritt in die Sepharose-Partikel zurückgehalten. Eine Auftrennung der γGlobuline von den viralen Vorläufer-Polypeptiden konnte jedoch nicht erreicht werden.

Zur Markierung der ausgeschlossenen Säulenvolumina wurde jeweils Dextran-Blau mit den markierten Zell-Lysaten mitchromatographiert.

8.2.5. Immunadsorption der viralen Antigene auf BrCN-aktivierter Sepharose 4B

Die aus Immunserum gereinigten γGlobuline können an BrCN-aktivierte Sepharose 4B gebunden werden. Die antigen reaktiven Gruppen der Antikörper bleiben dabei biologisch aktiv und die spezifischen Antigene binden an die Sepharose-gebundenen γGlobuline. Anschliessend an die Immunreaktion können die Antigene mit einem Puffer von tiefem pH von den Antikörpern dissoziiert und von der Trägersäule eluiert werden. Mit dieser Methode sollte es möglich sein, die viralen Vorläufer-Polypeptide aus dem markierten Zellextrakt zu isolieren.

Die γGlobuline wurden aus 2 ml Antiserum gegen detergentien-lysierte AMV-Partikel, das aus immunisierten Kaninchen gewonnen wurde, durch Zugabe von 2 ml 36% Na_2SO_4 während 2 Stunden bei 8-10° C präzipitiert. Das Präzipitat wurde zweimal mit 18% Na_2SO_4 gewaschen und die gewaschenen γGlobuline in 5 ml Kupplungspuffer (0.1 M $NaHCO_3$, 0.5 M NaCl) gelöst.

Die γGlobuline wurden an die BrCN-Gruppen der Sepharose 4B gebunden (Pharmacia - BrCN-activated Sepharose 4B for Immobilisation of Biopolymers).

Das kernfreie Lysat von ^{35}S-Met markierten Zellen wurde mit den γGlobulin-beladenen Sepharose-Partikeln zusammengebracht und über Nacht bei 4° C stehen gelassen. Anschliessend wurden die Sepharose-Partikel in eine Säule gepackt und die nicht immunadsorbierten Polypeptide mit ausreichend PBS aus der Säule gewaschen. Die adsorbierten Antigene wurden mit 0.1 M

Glyzin pH 2.2 von den Antikörpern dissoziiert, aus der Säule eluiert und in Fraktionen gesammelt. Jeder Fraktion wurde eine Probe entnommen und deren Radioaktivität gezählt. Die von den Antikörpern dissoziierten Antigene eluierten in einer scharfen Bande. Die Fraktionen, die markierte Polypeptide enthielten, wurden zusammengebracht und gegen Tris-NaCl-Puffer dialysiert.

Die Immunadsorption wurde mit Lysaten von uninfizierten und virusinfizierten Zellen durchgeführt. Markierte Polypeptide aus beiden Lysaten adsorbierten an die Trägersäule. Daraus liess sich errechnen, dass 94% der adsorbierten, markierten Polypeptide nicht virusspezifisch sind. Die Analyse der immunadsorbierten Polypeptide aus beiden Lysaten zeigte, dass die Adsorption der Polypeptide an die γGlobulin-beladene Sepharose im Wesentlichen unspezifisch war.

8.2.6. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der immunpräzipitierten Virus-Antigene

Vorerst sollte gezeigt werden, ob die immunpräzipitierten Polypeptide aus Lysaten von virusinfizierten Zellen, die mit NP-40 und DOC oder mit SDS in Tris-NaCl-Puffer lysiert wurden, untereinander vergleichbar sind. Hiezu wurden 2 Hühner-Fibroblasten-Kulturen während 10 Minuten mit ^{35}S-Met markiert und anschliessend mit 0.5% NP-40 und 0.5% DOC bzw. 0.5% SDS lysiert. Nach Immunpräzipitation wurden die viralen Polypeptide durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die zylindrischen Gele wurden in 2 mm Scheiben fraktioniert und die Polypeptide in 0.4 ml 0.1% SDS in 0.2 M Ammonium-Karbonat pH 8.5 und 20 µg/ml Pronase vom Gel eluiert. Nach Zugabe von 3.5 ml Aquasol wurden die Zählraten aller Fraktionen bestimmt. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die immunpräzipitierten Polypeptide von NP-40/DOC-lysierten Zellen und von SDS-lysierten Zellen qualitativ und quantitativ vergleichbar sind. SDS hemmt folglich die Immunpräzipitation der viralen Antigene aus dem Zell-Lysat nicht. Die viralen Polypeptide konnten deshalb durch Immunpräzipitation aus dem kernfreien Zellextrakt gereinigt und der Immunkomplex durch SDS-PAGE aufgetrennt werden, ohne ihre antigenen Eigenschaften zu verlieren. Das Gel wurde sofort nach der Elektrophorese unter Vakuum getrocknet (Fairbanks 1965). Die markierte virale Vorläufer-Polypeptidbande konnte durch Autoradiographie lokalisiert werden. Die aufgetrennte Polypeptidbande wurde aus dem Plattengel geschnitten, in eine Pasteur-Pipette eingeführt und in 15% Acrylamid/0.08% Bisacrylamid

einpolymerisiert. Am Anodenende des Zylindergels wurde ein mit Elektrophoresepuffer gefüllter Dialysesack angebracht. Die viralen Polypeptide wurden in den Dialysesack elektrophoretisiert. Das freie SDS im Elektrophoresepuffer wurde in Tris-NaCl-Puffer herausdialysiert oder durch Kältepräzipitation bei 4^{o} C ausgefällt. Die markierten Polypeptide blieben dabei in Lösung und konnten gegen Tris-NaCl-Puffer dialysiert werden.

Die aus dem SDS-Gel eluierten viralen Vorläufer-Polypeptide waren zu ungefähr 90% immunpräzipitierbar und wurden für Spaltungsversuche in vitro mit verschiedenen Virusfraktionen und Zellextrakten verwendet.

8.2.7. Fraktionierung der Zytoplasma-Membranen aus dem Homogenat von virusinfizierten Zellen

Während der Inkubation eines ultrabeschallten Lysats von virusinfizierten Zellen wurde ein Teil der intrazellulären, viralen Vorläufer-Polypeptide in gs-Virion-Polypeptide gespalten. Diese proteolytische Aktivität konnte nach der Zerstörung der Zellmembranen mit Chloroform oder Detergentien nicht mehr nachgewiesen werden (Vogt V. et al.). Da für die Spaltung des viralen Vorläufer-Proteins in gs-Virion-Proteine nicht lysierte Zellmembranen erforderlich sein könnten, wurden die an die Zellmembranen gebundenen viralen Vorläufer-Proteine zusammen mit den Zellmembranen fraktioniert und in vitro inkubiert.

Die virusinfizierten Zellen einer Gewebekulturschale wurden nach ^{35}S-Met-Markierung mit 5 ml RSB überschichtet und während 20 Minuten auf Eis stehen gelassen. Dann wurden 3.5 ml des hypotonischen Puffers abpipettiert und die Zellen mechanisch von der Haftfläche der Gewebekultur-Schale abgelöst. Die bei niedriger Tourenzahl sedimentierten Zellen wurden in 0.5 ml RSB suspendiert und in einem Homogenisator (Volumen 2 ml) mit 15 Pistillstreichen homogenisiert. Dabei wurden die Zellen aufgebrochen. Die Zellkerne blieben jedoch intakt und konnten bei 700 x g während 4 Minuten zentrifugiert werden. Der Ueberstand wurde abpipettiert und das Sediment noch zweimal mit 0.25 ml RSB homogenisiert und zentrifugiert. Die drei Zentrifugationsüberstände wurden zusammengebracht. Dem kernfreien Zell-Lysat wurde nach der modifizierten Methode von Perdue (Perdue 1971) kristalline Saccharose zu einer Endkonzentration von 55% zugefügt, und durch starkes Schütteln wurden die Zuckerkristalle im Lysat gelöst. Dem 55% Saccharose enthaltenden Zell-Lysat wurden 2.5 ml 50% Saccharose

in RSB und schliesslich 1.2 - 1.4 ml 20% Saccharose in RSB überschichtet. Der dreistufige Saccharose-Gradient wurde während 3 Stunden im SW-65-Rotor bei 55'000 UPM bei 2^{o} C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient in 25-Tropfen Fraktionen eingesammelt und von jeder Fraktion die Radioaktivität gezählt. Das Lysat wurde durch den Gradienten in 2 Radioaktivitätsbanden aufgetrennt. Die freien zytoplasmatischen Polypeptide wanderten in die Interphase von 55% und 50% Saccharose und die mit ^{3}H-Fettsäuren markierten Zellmembranen mit den daran gebundenen Polypeptiden in die Interphase von 50% und 20% Saccharose (Abb.30). Die Gradienten-Fraktionen, die freie zytoplasmatische Polypeptide enthielten, wurden zusammengebracht und gegen Tris-NaCl-Puffer dialysiert. Ebenso wurden die Gradientenfraktionen, die die ^{3}H-Fettsäuren markierten Zellmembranen enthielten, zusammengebracht und dialysiert. Beide Proben enthielten virale Vorläufer-Polypeptide und wurden für Inkubationsversuche oder für Zellmembranversuche verwendet.

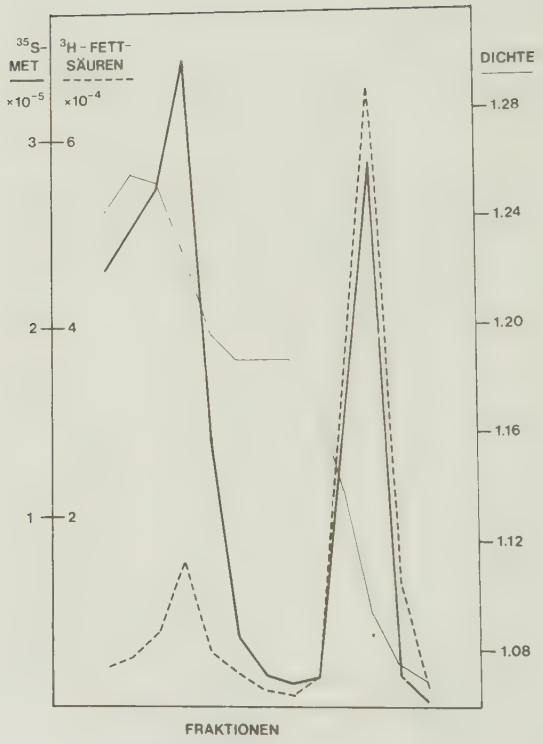


Abb. 30 : Auftrennung des ^{35}S-Met markierten kernfreien Lysats von AMV-infizierten Hühner-Fibroblasten durch einen dreistufigen Saccharose-Gradienten. Dem Zell-Lysat wurde Saccharose zu einer Endkonzentration von 55% zugegeben. Anschliessend wurde die Probe mit 50% Saccharose in RSB und 20% Saccharose in RSB überschichtet und während 3 Stunden im SW-65-Rotor bei 55'000 UPM und 2^{o} C zentrifugiert. Die nichtmembrangebundenen Proteine wanderten in die Interphase von 55%-50% Saccharose, die Zellmembranen in die Interphase 50%-20% Saccharose. Die Membranen wurden mit ^{3}H-Fettsäuren markiert.

9. Optimierung der Spaltungsbedingungen der viralen Vorläufer-Proteine im ultrabeschallten Zell-Lysat

Ein Teil der viralen Vorläufer-Proteine in einem ultrabeschallten Lysat von virusinfizierten Zellen werden während 30 Minuten Inkubation bei 37° C in gs-Virion-Proteine gespalten. Während einer 60 Minuten dauernden Inkubation des Lysats werden nicht mehr virale Vorläufer-Proteine in gs-Virion-Proteine gespalten, als während 30 Minuten Inkubation (Vogt V. et al.). Obwohl nur ein Teil der Vorläufer-Proteine in gs-Proteine gespalten werden, ist dieses System geeignet, um optimale Bedingungen für die Spaltung von viralen Vorläufer-Proteinen in vitro zu suchen.

^{35}S-Met markierte, virusinfizierte Zellen einer Gewebekulturschale wurden in 40 mM NaCl suspendiert und dreimal während 5 Sekunden ultrabeschallt. Das Zell-Lysat wurde bei verschiedenen $MgCl_2$-Konzentrationen und bei verschiedenen 2-Merkaptoäthanol-Konzentrationen während 30 Minuten bei 37° C inkubiert und anschliessend immunpräzipitiert. Der Immunkomplex wurde durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 31).

Enthielten die Zell-Lysate 25 mM oder höhere $MgCl_2$-Konzentrationen, so wurden vermehrt die nicht virusspezifischen Proteine präzipitiert. Bei erhöhter $MgCl_2$-Konzentration konnte vorab ein zelluläres Polypeptid von 45'000 Dalton Molekulargewicht im Präzipitat nachgewiesen werden.

Nach der Inkubation der ultrabeschallten Zell-Lysate bei verschiedenen 2-Merkaptoäthanol-Konzentrationen konnte keine unterschiedliche Protease-Aktivität am viralen Vorläufer-Protein nachgewiesen werden. Die Vorläufer-Proteine wurden jedoch in Gegenwart von 20 mM 2-Merkaptoäthanol im Zell-Lysat nurmehr vermindert immunpräzipitiert. Es ist bekannt, dass bei einer Konzentration von mehr als 10 mM 2-Merkaptoäthanol die meisten Disulfid-Brücken der Proteine reduziert werden.

Die markierten, ultrabeschallten Lysate virusinfizierter Zellen wurden ebenso bei verschiedenen pH-Werten inkubiert, um einen möglichen Einfluss der pH-Werte auf die Protease-Aktivität am viralen Vorläufer-Protein aufzuzeigen (Abb. 32).

Im nicht inkubierten Zell-Lysat, das bei pH 7.5 immunpräzipitiert wurde, konnten nebst dem viralen Vorläufer-Protein auch gs-Virion-Proteine nachgewiesen werden. Das Vorläufer-Protein wurde demnach während der Markierung oder möglicherweise während der Aufarbeitung der Probe gespalten.

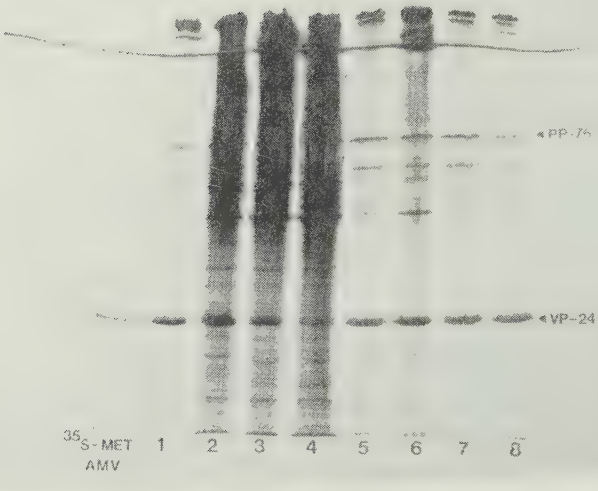


Abb. 31 : Autoradiographie der durch SDS-PAGE aufgetrennten markierten Virus-Polypeptide.
Die viralen Vorläufer-Polypeptide (PP) in einem ultrabeschallten Zell-Lysat wurden in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von $MgCl_2$ und 2-Merkaptoäthanol während 30 Minuten inkubiert und anschliessend immunpräzipitiert. Als Standard-Polypeptide wurden markierte AMV-Polypeptide elektrophoretisch aufgetrennt.

Probe Nr.	$MgCl_2$-Konzentration (mM)	2-Merkaptoäthanol-Konzentration (mM)
1	5	-
2	25	-
3	50	-
4	100	-
5	-	2.5
6	-	5
7	-	10
8	-	20

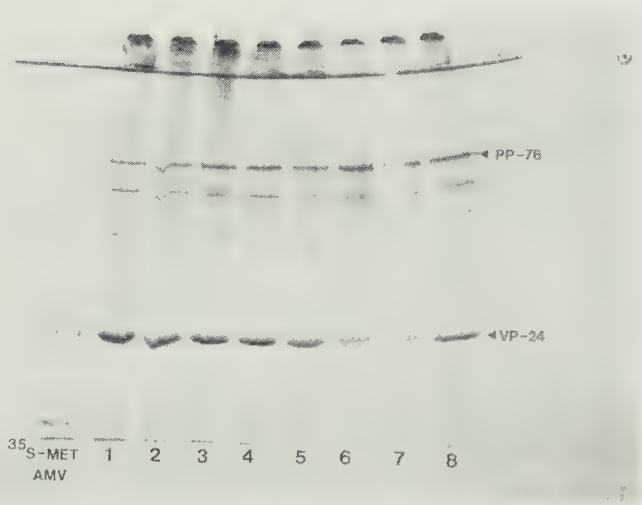


Abb. 32 : Autoradiographie der durch SDS-PAGE aufgetrennten markierten Virus-Polypeptide.
Die viralen Vorläufer-Polypeptide (PP) in einem ultrabeschallten Zell-Lysat wurden bei verschiedenen pH-Werten inkubiert und anschliessend immunpräzipitiert. Die ^{35}S-Met markierten AMV-Polypeptide dienten als Standard-Polypeptide.

Probe Nr.	pH-Wert	Inkubationsdauer (Min)
1	6.0	30'
2	6.5	30'
3	7.0	30'
4	7.5	30'
5	8.0	30'
6	8.5	30'
7	9.0	30'
8	7.5	-

Die viralen Vorläufer-Polypeptide in den Zell-Lysaten, die bei pH 6.0 bis 8.5 inkubiert wurden, konnten nach Immunpräzipitation und SDS-PAGE des Immunkomplexes bei allen Proben mit verschiedenen pH-Werten in ähnlicher Menge nachgewiesen werden. Der Anteil von gs-Virion-Polypeptiden von 24'000 Dalton Molekulargewicht war bei der pH 6.0-Probe am grössten und nahm mit steigenden pH-Werten ab. Obwohl bei höheren pH-Werten weniger gs-Virion-Polypeptide nachgewiesen werden konnten, nahm die Menge der viralen Vorläufer-Polypeptide nicht in gleichem Masse zu. Da die Gesamt-Menge der markierten viralen Polypeptide mit steigendem pH-Wert abnimmt und nach dem Vergleich der inkubierten Proben mit der nicht inkubierten Probe kann gefolgert werden, dass nicht die Protease-Aktivität am viralen Vorläufer-Protein, sondern die Immunpräzipitation pH-abhängig ist. Nach der Inkubation und Immunpräzipitation des Zell-Lysats bei pH 9.0 zeigte sich eine quantitative Abnahme aller markierten Polypeptide im Immunpräzipitat.

Um nachzuweisen, ob die Immunpräzipitierbarkeit der viralen Polypeptide aus dem detergentienlysierten Zellextrakt über längere Zeit erhalten bleibt, wurden die virusinfizierten Zellen nach ^{35}S-Met-Markierung mit 0.5% NP-40 und 0.5% DOC lysiert. Das kernfreie Lysat wurde in 2 Teile aufgeteilt. Der eine Teil wurde sofort immunpräzipitiert, der andere Teil wurde vorerst während 24 Stunden bei 4^{o} C aufbewahrt und danach immunpräzipitiert. Die präzipitierten Polypeptide wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, die zylindrischen Gele in 2 mm Scheiben fraktioniert und die Radioaktivität der vom SDS-Gel eluierten, markierten Polypeptide gezählt (Abb. 33). Die beiden Immunpräzipitate wiesen ähnliche Zählraten markierter Polypeptide auf und die einzelnen Polypeptide konnten nach SDS-PAGE-Auftrennung bei beiden Immunpräzipitaten in ähnlichem Verhältnis nachgewiesen werden. Die viralen Polypeptide können demnach im Zell-Lysat über längere Zeit bei 4^{o} C aufbewahrt werden, ohne die Immunpräzipitation quantitativ oder qualitativ zu beeinflussen.

Die Aufarbeitung der Proben dauerte oftmals mehrere Stunden. Deshalb sollte in Vorversuchen gezeigt werden, ob die virusspezifische Protease-Aktivität im infizierten Zell-Lysat über längere Zeit bei 4^{o} C erhalten bleibt. Hiezu wurden markierte, virusinfizierte Zellen ultrabeschallt (3 x 5 Sekunden) und das Lysat in 2 gleiche Teile aufgeteilt. Die eine

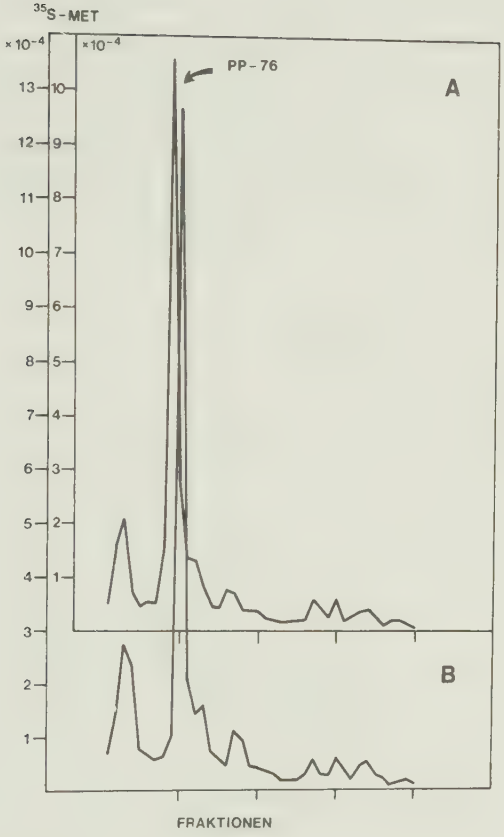


Abb. 33 : Die AMV-infizierten Zellen einer Gewebekulturschale wurden während 10 Minuten mit ^{35}S-Met markiert und anschliessend wurden die gewaschenen Zellen mit 0.5% NP-40 und 0.5% DOC lysiert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation aus dem Zell-Lysat sedimentiert. Das kernfreie Lysat wurde in 2 Hälften geteilt:

Bild A: Die Probe wurde sofort mit Kaninchen-Immunserum gegen lysierte AMV-Partikel immunpräzipitiert.
Bild B: Die Probe wurde vorerst während 24 Stunden bei 4° C aufbewahrt und anschliessend immunpräzipitiert.

Die Präzipitate der beiden Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die zylindrischen Gele in 2 mm Scheiben fraktioniert. Die Polypeptide wurden mit 0.4 ml 0.1% SDS in 0.2 M Ammoniumkarbonat pH 8.5 und 20 µg/ml Pronase aus dem Gel eluiert. Nach Zugabe von 3.5 ml Aquasol wurden die Zählraten aller Fraktionen im Scintillationszähler bestimmt.
Bei der hochmolekularen Polypeptidbande könnte es sich um ein Aggregat von viralen Polypeptiden handeln.

Hälfte wurde unmittelbar nach Ultrabeschallung während 30 Minuten inkubiert und anschliessend immunpräzipitiert. Die andere Hälfte wurde vorerst während 24 Stunden bei 4^{o} C aufbewahrt, dann 30 Minuten inkubiert und immunpräzipitiert. Die beiden Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE analysiert. Die markierten Polypeptide waren qualitativ und quantitativ ähnlich. Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass das virusinfizierte Zell-Lysat während 24 Stunden bei 4^{o} C aufbewahrt werden kann, ohne die virusspezifische Proteasenaktivität zu beeinflussen. (Abb. 34)

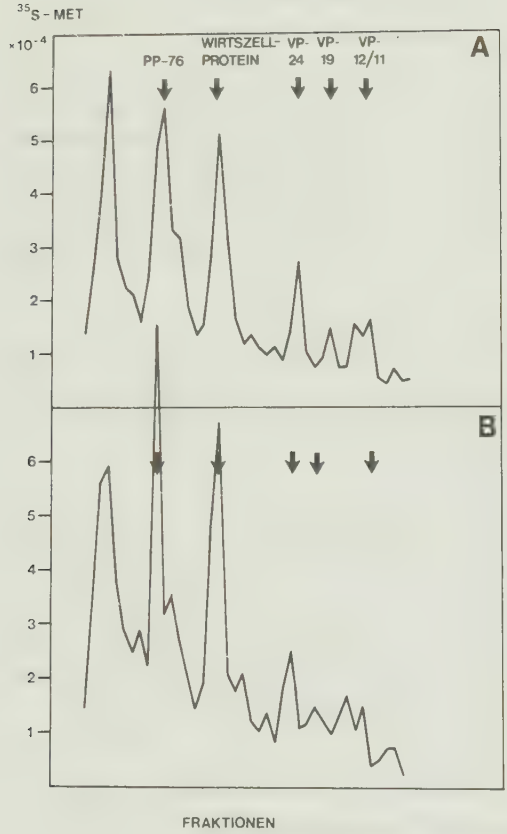


Abb. 34 : Die AMV-infizierten Zellen einer Gewebekulturschale wurden während 10 Minuten mit ^{35}S-Met markiert und anschliessend wurden die gewaschenen Zellen während 3 mal 5 Sekunden ultrabeschallt (Branson-Sonifier Stufe 5). Das Homogenat wurde in 2 Hälften aufgeteilt:

Bild A: Das Homogenat wurde während 30 Minuten bei 37^{o} C inkubiert und anschliessend immunpräzipitiert.

Bild B: Das Homogenat wurde vorerst während 24 Stunden bei 4^{o} C aufbewahrt, hernach während 30 Minuten inkubiert und schliesslich immunpräzipitiert.

Die beiden Präzipitate wurden analysiert (siehe Legende zu Abb. 33).

10. Versuche in vitro zur Spaltung von isolierten viralen Vorläufer-Polypeptiden in gruppenspezifische Virion-Polypeptide

Virusinfizierte Hühner-Fibroblasten wurden nach ^{35}S-Met Markierung mit Detergentien lysiert und die viralen Proteine aus dem Lysat immunpräzipitiert. Der Immunkomplex wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und die viralen Vorläufer-Polypeptide aus dem Gel eluiert. Die markierten Polypeptide wurden mit unmarkierten, intakten oder aufgebrochenen AMV-Partikeln oder mit Lysaten von uninfizierten oder AMV-infizierten Zellen inkubiert. Das Inkubat wurde anschliessend immunpräzipitiert und der Immunkomplex durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

10.1. Versuche in vitro zur Spaltung der immunpräzipitierten viralen Vorläufer-Polypeptide (Antigen-Antikörper-Komplex)

Das Immunpräzipitat aus dem Extrakt von virusinfizierten Zellen wurde in 0.2 ml Tris-NaCl-Puffer suspendiert und in 4 gleiche Teile aufgeteilt. Die Probe 1 wurde als Kontrolle sogleich immunpräzipitiert, währenddem die Probe 2 vorerst inkubiert und hernach immunpräzipitiert wurde. Der Probe 3 wurden aufgebrochene AMV-Partikel und der Probe 4 unmarkiertes Lysat von virusinfizierten Zellen zugegeben. Die Proben 2-4 wurden bei 37^{o} C während 60 Minuten inkubiert und anschliessend immunpräzipitiert. Der Immunkomplex wurde durch SDS-PAGE analysiert.

Nach der Autoradiographie des getrockneten Gels konnten bei der nicht inkubierten Kontrolle und in den inkubierten Proben die gleichen markierten Polypeptidbanden nachgewiesen werden. Weder in der inkubierten Kontrolle (Probe 2), noch in den mit Virus-Partikeln oder Zell-Lysat inkubierten Proben konnte eine Spaltungsaktivität am viralen Vorläufer-Protein nachgewiesen werden. (Die Autoradiographie der durch SDS-PAGE aufgetrennten, markierten Polypeptide wurde nicht abgebildet.)

10.2. Versuche in vitro zur Spaltung der aus dem SDS-Gel eluierten viralen Vorläufer-Polypeptide

Die ^{35}S-Met markierten viralen Polypeptide wurden aus dem AMV-infizierten Zell-Lysat immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die viralen Vorläufer-Polypeptide wurden aus dem Gel eluiert. Das freie SDS wurde durch Kältepräzipitation und Dialyse aus der Polypeptid-

Suspension entfernt. Das gereinigte Vorläufer-Polypeptid wurde mit intakten oder aufgebrochenen AMV-Partikeln oder mit Lysaten von AMV-infizierten oder uninfizierten Zellen inkubiert.

Versuch 1 : Den isolierten viralen Vorläufer-Polypeptiden von 76'000 Dalton Molekulargewicht wurden unmarkierte, intakte oder aufgebrochene AMV-Partikel zugegeben. Die Polypeptidsuspensionen wurden während 30 bis 120 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Inkubate wurden immunpräzipitiert und die Präzipitate durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die markierten Polypeptide wurden durch Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 35).

Nach kurzer oder längerer Inkubationszeit konnte keine Protease-Aktivität am viralen Vorläufer-Polypeptid nachgewiesen werden. Sowohl die nicht inkubierte Kontrolle, als auch die selbstinkubierte Kontrolle zeigten ein ähnliches Muster der markierten Polypeptide wie die inkubierten Proben.

Versuch 2 : Die möglicherweise in AMV-Partikeln vorhandenen Protease-Enzyme könnten in ungenügender Konzentration vorhanden sein, um die isolierten viralen Vorläufer-Polypeptide in vitro zu spalten. Deshalb wurde ein AMV-Konzentrat fraktioniert. Die nachfolgend beschriebenen Virusfraktionen sind Zwischenprodukte oder das Endprodukt der Reinigung von RNS-abhängiger DNS-Polymerase. Sie wurden mir von Dr. H. Diggelmann überlassen:

DEAE - F 19 : Diese Bezeichnung steht für die Fraktion 19 der DEAE-Säulenchromatographie des NP-40-lysierten AMV-Konzentrats. Es ist eine der Durchlauffraktionen der Säule. Der Grossteil der viralen Polypeptide eluieren in den Durchlauffraktionen. Die optische Dichte (OD_{280}) war grösser als 2. Nach der Auftrennung der Polypeptide der Fraktion 19 durch SDS-PAGE liessen sich 4 Polypeptide mit einem Molekulargewicht zwischen 20'000 und 40'000 Dalton und ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht grösser als 70'000 Dalton nachweisen.

DEAE - F 30 : Die Fraktion der DEAE-Säulenchromatographie enthält 6, durch SDS-PAGE nachweisbare Polypeptide von einem Molekulargewicht grösser als 70'000 Dalton. Die OD_{280} betrug 2.0. Die Aktivität der RNS-abhängigen DNS-Polymerase wurde in den

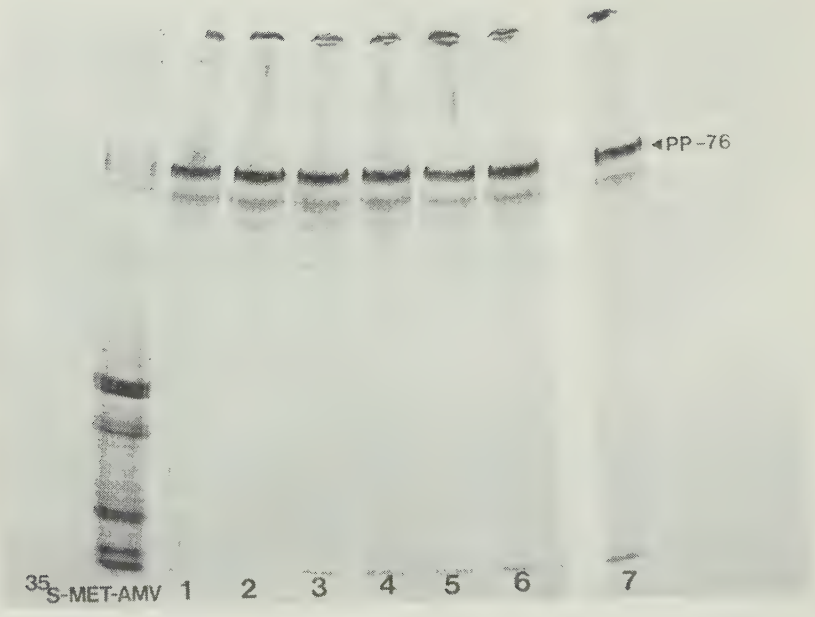


Abb. 35 : Autoradiographie der durch SDS-PAGE aufgetrennten viralen Polypeptide.
Die vom SDS-Gel eluierten viralen Vorläufer-Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 76'000 Dalton (PP-76) wurden in Gegenwart von intakten oder aufgebrochenen Virus-Partikeln während 30 bis 120 Minuten inkubiert.

Inkubations-Bedingungen:		Proben-Nr.: 1	2	3	4	5	6	7
PP-76 (6'000 cpm/10 µl)	µl	40	40	40	40	40	40	40
Aufgebrochene AMV-Partikel (19.6 µg Virusproteine/100 µl)	µl	-	-	50	50	50	50	-
Intakte AMV-Partikel (9.8 µg Virusproteine/10 µl)	µl	-	-	-	-	-	-	10
Tris-NaCl-Puffer pH 7.5	µl	50	50	-	-	-	-	40
Inkubationsdauer bei 37° C	Min	-	120'	30'	60'	90'	120'	120'

Fraktionen 34-48 der Säulenchromatographie nachgewiesen. Diese Fraktionen wurden zusammengebracht und durch eine Phosphozellulose-11-Säule mit einem linearen Salzgradienten chromatographiert.

PC - F 6 : bezeichnet die Fraktion 6 der Durchlaufs durch die Phosphozellulose-11-Säule. Die OD_{280} betrug 0.6. Durch SDS-PAGE wurden bei dieser Fraktion 6 Polypeptide mit einem Molekulargewicht grösser als 70'000 Dalton aufgetrennt. Die RNS-abhängige DNS-Polymerase eluierte bei einer Salz-Konzentration von 0.2 bis 0.5 M NaCl.

RT : Die RNS-abhängige DNS-Polymerase (Reverse-Transcriptase) besteht aus 2 Polypeptiden von 62'000 Dalton und 95'000 Dalton Molekulargewicht (Gibson 1974). Die OD_{280} der verwendeten Proteinlösung betrug 0.165.

Die aus dem SDS-Gel eluierten Vorläufer-Polypeptide wurden mit den verschiedenen Virusfraktionen und mit Trypsin-TPCK bei pH 6.5 inkubiert. Bei den mit Trypsin inkubierten Proben sollte gezeigt werden, dass die SDS-behandelten Polypeptide als Enzymsubstrate gegenüber Proteasen empfindlich sind. TPCK hemmt die Chymotrypsin-Aktivität der Protease. Die Endkonzentration von Trypsin im Inkubat betrug 1.25%. Die mit den verschiedenen Virusfraktionen oder mit Trypsin inkubierten Proben wurden immunpräzipitiert. Eine zweite mit Trypsin inkubierte Probe wurde TCA-präzipitiert. Die Präzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die markierten Polypeptide durch Autoradiographie nachgewiesen (Abb. 36). In keiner der verschiedenen Virusfraktionen konnte eine Proteaseaktivität am viralen Vorläufer-Polypeptid gezeigt werden. Die Polypeptidmuster der verschiedenen Proben sind ähnlich den Polypeptidmustern der nicht inkubierten und der selbstinkubierten Kontrollen. Die tryptische Spaltung von Vorläufer-Proteinen wurde bereits früher für die Darstellung des Peptidmusters durchgeführt (Vogt und Eisenmann 1973). Erwartungsgemäss wurden die im durchgeführten Versuch mit Trypsin inkubierten Vorläufer-Polypeptide gänzlich verdaut. Die aus dem SDS-Gel eluierten viralen Vorläufer-Polypeptide könnten grundsätzlich durch Proteasen gespalten werden.

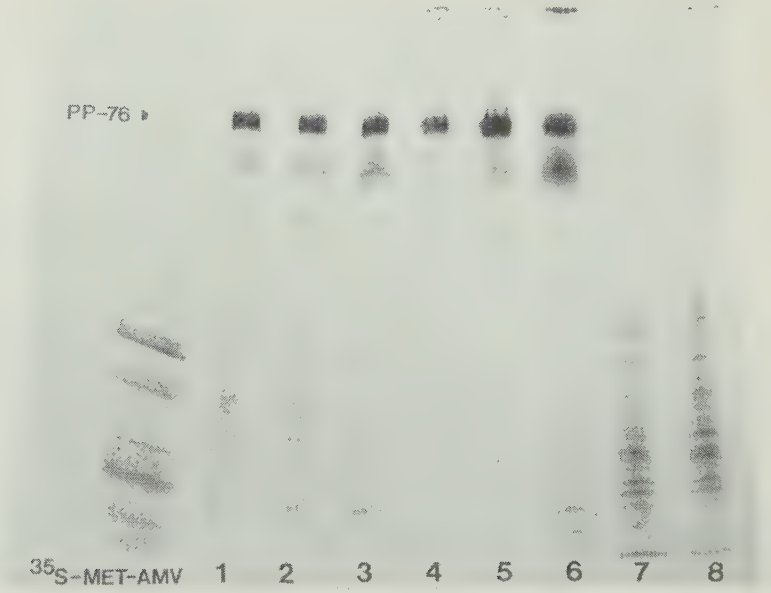


Abb. 36 : Autoradiographie der durch SDS-PAGE aufgetrennten viralen Polypeptide.

Die isolierten viralen Vorläufer-Polypeptide von 76'000 Dalton Molekulargewicht (PP-76) wurden mit verschiedenen Virus-Fraktionen (siehe Text) und mit Trypsin-TPCK inkubiert:

Inkubations-Bedingungen:		Proben-Nr.: 1	2	3	4	5	6	7	8
PP-76 (5000 cpm/10 µl)	µl	200	200	200	200	200	200	200	200
PC - F 6	µl	-	-	100	-	-	-	-	-
DEAE - F 19	µl	-	-	-	100	-	-	-	-
DEAE - F 30	µl	-	-	-	-	100	-	-	-
RT	µl	-	-	-	-	-	25	-	-
Trypsin-TPCK (1 mg/ml)	µl	-	-	-	-	-	-	5	5
H_2O	µl	100	100	-	-	-	75	95	95
Tris-NaCl-Puffer 0.2 M pH 6.5	µl	100	100	100	100	100	100	100	100
Inkubationsdauer bei 37^0 C	Min	-	60'	60'	60'	60'	60'	60'	60'

Versuch 3 : Die isolierten viralen Vorläufer-Polypeptide wurden mit den unmarkierten, ultrabeschallten Lysaten von uninfizierten und von AMV-infizierten Hühner-Fibroblasten inkubiert. Nach der Immunpräzipitation der Proben und der Auftrennung des Immunkomplexes durch SDS-PAGE konnte durch Autoradiographie gezeigt werden (Abb. 37), dass das virale Vorläufer-Polypeptid weder mit AMV-infizierten, noch mit uninfizierten Wirtszell-Lysaten in niedermolekulare gs-Polypeptide gespalten werden kann.

Aehnliche in vitro Versuche mit viralen Vorläufer-Polypeptiden wurden in Gegenwart von 5 mM $MgCl_2$ oder mit Vorläufer-Polypeptiden von 66'000 Dalton Molekulargewicht durchgeführt. Die viralen Vorläufer-Polypeptide wurden in keinem Versuch in niedermolekulare Virion-Polypeptide gespalten.

Während der Inkubation von isolierten viralen Vorläufer-Polypeptiden mit verschiedenen viralen oder zellulären Fraktionen konnte weder eine spezifische, noch eine unspezifische Spaltung des Vorläufer-Polypeptids nachgewiesen werden. Eine spezifische Protease -Aktivität könnte durch die Anwesenheit von gs-Virion-Polypeptiden nach Immunpräzipitation durch SDS-PAGE und Autoradiographie gezeigt werden. Da nach Immunpräzipitation der Proben stets gleich viel Radioaktivität im Immunkomplex der inkubierten Proben wie im Immunkomplex der nicht inkubierten Kontrolle gezählt werden konnte, fand auch keine unspezifische Spaltung der viralen Vorläufer-Polypeptide statt. Nach der Immunpräzipitation der vom SDS-Gel eluierten viralen Vorläufer-Polypeptide konnte ungefähr 90% der Radioaktivität wiederum im Immunkomplex nachgewiesen werden.

10.3. Versuche in vitro zur Spaltung der an Zellmembranen gebundenen viralen Vorläufer-Polypeptide

Die aus dem SDS-Gel eluierten viralen Vorläufer-Polypeptide konnten bei in vitro Versuchen nicht zu gs-Virion-Polypeptiden gespalten werden. Möglicherweise müsste das Enzymsubstrat in einer bestimmten Konfiguration oder in Verbindung mit einer subzellulären Fraktion sein, um von den spezifischen Proteasen gespalten zu werden.

Abb. 37 : Autoradiographie der durch SDS-PAGE aufgetrennten viralen Polypeptide.

Die viralen Vorläufer-Polypeptide von 76'000 Dalton Molekulargewicht (PP-76) wurden mit ultrabeschallten Lysaten von virusinfizierten und uninfizierten Hühner-Fibroblasten inkubiert:

Inkubations-Bedingungen:		Proben-Nr.: 1	2	3
PP-76 (3000 cpm/10 µl)	µl	150	200	200
Lysat von uninfizierten Hühner-Fibroblasten	µl	-	800	-
Lysat von AMV-infizierten Hühner-Fibroblasten	µl	-	-	800
Tris-NaCl-Puffer pH 7.5	µl	850	-	-
Inkubationsdauer bei 37^{o} C	Min	60'	60'	60'

Es konnte gezeigt werden, dass die viralen Vorläufer-Polypeptide in einem ultrabeschallten Zell-Lysat nicht mehr gespalten werden, nachdem die Zellmembranen mit Detergentien zerstört wurden (Vogt V. et al.). Da nicht lysierte Zellmembranen für die Protease-Aktivität am viralen Vorläufer-Polypeptid nötig sein könnten, wurden die an die Zellmembranen gebundenen viralen Vorläufer-Polypeptide isoliert und anschliessend inkubiert. Die Methode zur Membranisolierung wurde in 8.2.7. beschrieben.

Versuch 1 : AMV-infizierte Hühner-Fibroblasten wurden während 10 Minuten mit ^{35}S-Met markiert und anschliessend homogenisiert. Die Zellmembranen wurden durch einen dreistufigen Saccharose-Gradienten fraktioniert. Die Membranfraktion wurde gegen Tris-NaCl-Puffer dialysiert und in mehrere Proben aufgeteilt, die mit aufgebrochenen AMV-Partikeln oder mit Lysat von virusinfizierten Zellen inkubiert wurden. Als Kontrollen wurden eine Probe ohne vorangehende Inkubation immunpräzipitiert und eine Probe nach Inkubation immunpräzipitiert (Abb. 38).

Durch Autoradiographie konnte gezeigt werden, dass die Kontrollen und die mit Virus-Partikeln oder Zell-Lysat inkubierten Proben ähnliche Peptidmuster aufweisen. Eine Protease-Aktivität am viralen Vorläufer-Polypeptid konnte in keinem der verschiedenen Inkubate nachgewiesen werden. Virale Vorläufer-Polypeptide waren auch in den nichtmembrangebundenen zytoplasmatischen Proteinen nachweisbar.

Versuch 2 : Virusinfizierte Hühner-Fibroblasten wurden während 10 Minuten mit ^{35}S-Met markiert und das kernfreie Zellhomogenat in die nichtmembrangebundenen zytoplasmatischen Polypeptide und in die Membranfraktion aufgetrennt. Da virale Vorläufer-Polypeptide sowohl in der Membranfraktion, als auch in der zytoplasmatischen Polypeptidfraktion nachgewiesen werden konnten, wurden Proben der beiden Fraktionen mit aufgebrochenem Virus oder mit Lysat von virusinfizierten Zellen inkubiert. Die Inkubate wurden nach Immunpräzipitation durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Polypeptide aus den zylindrischen Gelen eluiert. Die Radioaktivität der markierten Polypeptide in den einzelnen Gelfraktionen wurden im Scintillationszähler bestimmt (Abb. 39).

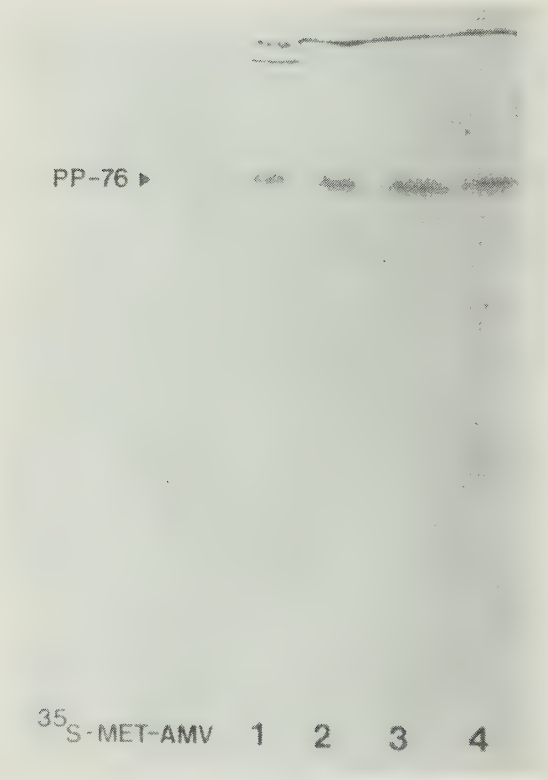


Abb. 38 : Autoradiographie der durch SDS-PAGE aufgetrennten viralen Polypeptide.

Die an die Zellmembranen gebundenen viralen Vorläufer-Proteine wurden mit aufgebrochenen AMV-Partikeln oder mit dem Lysat von AMV-infizierten Hühner-Fibroblasten inkubiert:

Inkubations-Bedingungen:		Proben-Nr.: 1	2	3	4
Membransuspension (6000 cpm/10 µl)	µl	60	60	60	60
Aufgebrochene AMV-Partikel (19.6 µg Virusproteine/100 µl)	µl	-	-	-	100
Lysat von AMV-infizierten Hühner-Fibroblasten	µl	-	-	100	-
Tris-NaCl-Puffer pH 7.5	µl	100	100	-	-
Inkubationsdauer bei 37° C	Min	-	30'	30'	30'

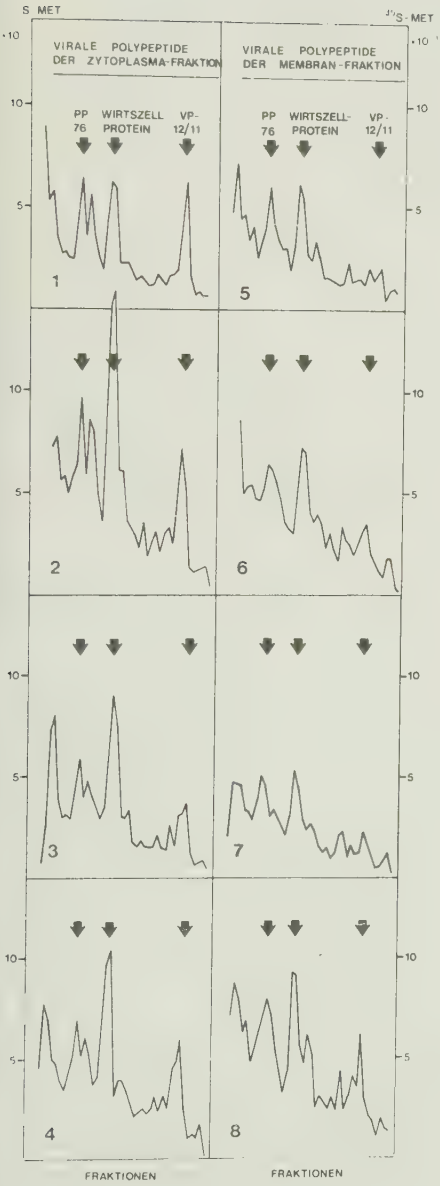


Abb. 39 :

Die ^{35}S-Met markierten Polypeptide von AMV-infizierten Hühner-Fibroblasten wurden in die membrangebundenen Polypeptide und in die nichtmembrangebundenen Polypeptide aufgetrennt (siehe Text 8.2.7.). Beide Fraktionen wurden in 4 Teile aufgeteilt:

Bilder 1 - 4: Virale Polypeptide der Zytoplasma-Fraktion.

Bilder 5 - 8: Virale Polypeptide der Membran-Fraktion.

Bilder 1 und 5: Kontrollen: Die Proben wurden ohne vorangehende Inkubation immunpräzipitiert.

Bilder 2 und 6: Die Proben wurden während 30 Minuten inkubiert und anschliessend immunpräzipitiert.

Bilder 3 und 7: Die Proben wurden in Gegenwart von aufgebrochenen AMV-Partikeln während 30 Min. inkubiert und anschliessend immunpräzipitiert.

Bilder 4 und 8: Die Proben wurden in Gegenwart von Lysat aus AMV-infizierten Hühner-Fibroblasten inkubiert und anschliessend immunpräzipitiert.

Die verschiedenen Präzipitate wurden analysiert (siehe Legende zu Abb. 33).

Weder die viralen Vorläufer-Proteine in der zytoplasmatischen Fraktion, noch die viralen Vorläufer-Proteine in der Membranfraktion waren während der Inkubation in Gegenwart von aufgebrochenen Virus-Partikeln oder Lysat von virusinfizierten Zellen in gs-Virion-Proteine gespalten worden.

11. Studien zur Beziehung zwischen viralen Vorläufer-Polypeptiden und der Zellmembran

Nach der Auftrennung des markierten Lysats von virusinfizierten Hühner-Fibroblasten in eine Zellmembran-Fraktion und in eine Fraktion der nichtmembrangebundenen zytoplasmatischen Polypeptide konnten aus beiden Fraktionen virale Vorläufer-Polypeptide immunpräzipitiert werden. Ob die viralen Polypeptide im Zytoplasma und in oder an den Zellmembranen lokalisiert sind, oder ob die viralen Polypeptide als Folge eines methodischen Artefakts in beiden Fraktionen nachgewiesen werden konnten, sollte in den folgenden Versuchen gezeigt werden. Die Zellmembranen von Hühner-Fibroblasten wurden in Gegenwart von nichtmembrangebundenen zytoplasmatischen Polypeptiden einer andern Zellkultur fraktioniert und die Natur der Bindung der an die Zellmembranen haftenden zytoplasmatischen Polypeptide untersucht:

Virusinfizierte Hühner-Fibroblasten wurden während 30 Minuten mit ^{35}S-Met markiert und anschliessend homogenisiert. Das kernfreie Zell-Lysat wurde nach der in 8.2.7. beschriebenen Methode in die Zell-Membranfraktion und in die zytoplasmatische Polypeptidfraktion aufgetrennt.

Die Zellmembranen virusinfizierter Hühner-Fibroblasten einer weitern Zellkultur wurden während 20 Stunden mit 200 µC ^{3}H-Fettsäuren markiert. Die gewaschenen, markierten Zellen wurden anschliessend mit 5 ml RSB überschichtet und 20 Minuten auf Eis stehen gelassen. 3.5 ml RSB wurden abpipettiert und die im hypertonischen Puffer gequollenen Zellen mechanisch von der Haftfläche abgelöst. Die Zellen wurden bei niedriger Tourenzahl sedimentiert und in 1.0 ml Suspension von ^{35}S-Met markierten nichtmembrangebundenen Polypeptiden homogenisiert. Das Zell-homogenat wurde bei 700 x g zentrifugiert und der kernfreie Ueberstand durch den dreistufigen Saccharose-Gradienten aufgetrennt (Die Methode wurde in 8.2.7. beschrieben). Nach der Zentrifugation wurden 14 Fraktionen zu 25 Tropfen eingesammelt und von jeder Fraktion eine Probe entnommen, deren ^{3}H- und ^{35}S-Zählraten bestimmt wurden (Abb. 40). Dadurch konnte gezeigt werden, dass 8.5% der nichtmembrangebundenen, ^{35}S-Met markierten Polypeptide während der Homogenisation und Fraktionierung an die ^{3}H-Fettsäuren markierten Zellmembranen binden. Die Membranfraktionen, die zytoplasmatische Polypeptide enthielten, wurden zusammengebracht, in drei gleiche Teile (A,B,C) aufgeteilt und wie folgt behandelt:

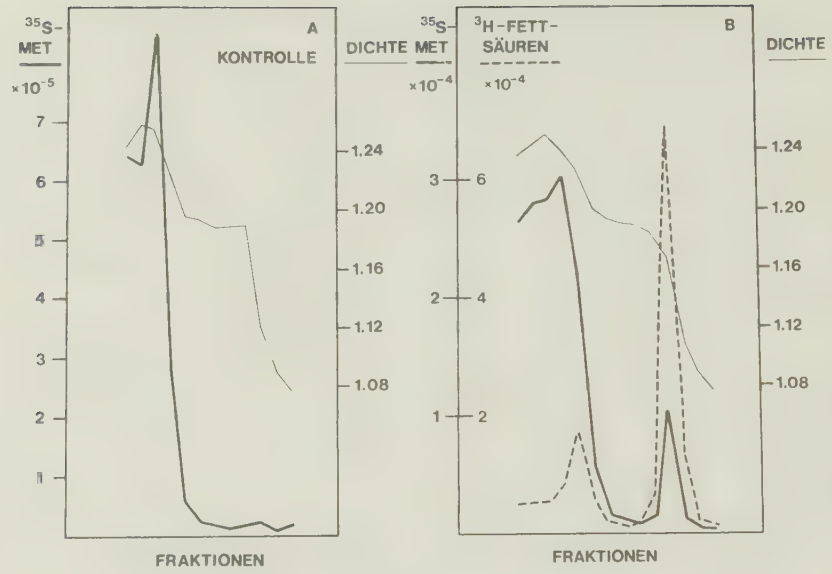


Abb. 40 : Die ^{35}S-Met markierten nichtmembrangebundenen Polypeptide wurden vorerst durch einen dreistufigen Saccharose-Gradienten isoliert. Die Zellmembranen einer zweiten Zellkultur wurden mit ^{3}H-Fettsäuren markiert. Die markierten Membranen wurden in Gegenwart von nichtmembrangebundenen, ^{35}S-Met markierten Polypeptiden gereinigt (siehe Text).

Bild A: Kontrolle: Die ^{35}S-Met markierten nichtmembrangebundenen Polypeptide wurden ein zweites Mal durch den dreistufigen Saccharose-Gradienten zentrifugiert.

Bild B: Die ^{3}H-Fettsäuren markierten Membranen wurden in Gegenwart von nichtmembrangebundenen, ^{35}S-Met markierten Polypeptiden isoliert. 8.5 der nichtmembrangebundenen Polypeptide fraktionierten mit den Membranen.

A	B	C
0.33 ml Membran-Suspension	0.33 ml Membran-Suspension	0.33 ml Membran-Suspension
2.66 ml RSB	0.66 ml RSB	2.66 ml Salzlösung: 0.01 M Tris pH 7.5, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 M Na_2SO_4
	2 ul 10% DOC (0.02% Endkonz.)	
	30 Min. auf Eis stehen lassen	
	2 ml RSB	

Die 3 Proben wurden nach Zugabe von kristalliner Saccharose zu einer Endkonzentration von 55% und nach Ueberschichtung mit 50% und 20% Saccharose in RSB wiederum zentrifugiert (siehe 8.2.7.). Die nach der Zentrifugation eingesammelten 25-Tropfen-Fraktionen wurden TCA-präzipitiert, das Präzipitat mit 6% TCA und kaltem Azeton gewaschen und die ^3H- und ^{35}S-Zählraten pro Fraktion gezählt (Abb. 41).

In der unbehandelten Kontrolle (A) dissoziierten 50% der markierten Polypeptide von den Membranen und fraktionierten mit der zytoplasmatischen Polypeptidbande. In der DOC-behandelten Probe (B) dissoziierten 33% und in der mit hoher Salzkonzentration behandelten Probe (C) 50% der markierten Polypeptide von den Membranen. Die Behandlungen der Proben mit Natrium-Deoxycholat oder mit hoher Salzkonzentration beeinflussten die Dissoziation der zytoplasmatischen Polypeptide von der Zellmembran nicht. Würden die zytoplasmatischen Polypeptide durch eine einfache Ionenbindung an die Zellmembranen gebunden, so müssten sie durch die Behandlung mit der hohen Salzkonzentration von den Zellmembranen abgelöst werden können. Während der Fraktionierung der Membranen in Gegenwart von $MgCl_2$ in RSB werden die Membranen zu vesikulären Strukturen geformt (Dalton 1968). In diese Strukturen könnten die zytoplasmatischen Polypeptide während der Aufarbeitung der Zellmembranen eingeschlossen werden. DOC verursacht kleine Oeffnungen in den vesikulären Membranfragmenten. Durch diese Oeffnungen würden zumindest ein Teil der zytoplasmatischen Polypeptide austreten. Der Versuch zeigte, dass DOC die Dissoziation der Polypeptide von der Zellmembran nicht beeinflusste. Daraus schliessen wir, dass die zytoplasmatischen Polypeptide nicht in einfacher Art in die vesikulären Membranfragmente eingeschlossen werden.

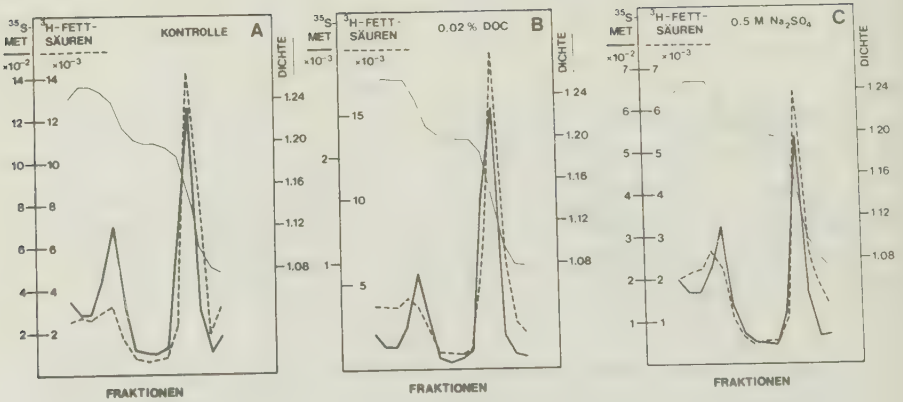


Abb. 41 : Die Membranfraktionen, die ^{35}S-Met markierte und in vitro assoziierte Polypeptide enthielten (Abb. 40 B), wurde in 3 Teile aufgeteilt:

Bild A: Kontrolle: Die Probe wurde ohne weitere Behandlung ein zweites Mal durch den dreistufigen Saccharose-Gradienten zentrifugiert.

Bild B: Der Probe wurde DOC (0.02% Endkonzentration) zugegeben. Anschliessend wurde die Probe während 30 Minuten auf Eis stehen gelassen und hernach durch den Saccharose-Gradienten aufgetrennt.

Bild C: Der Probe wurde die folgende Salzlösung zugegeben:
0.01 M Tris pH 7.5
1.5 mM $MgCl_2$
0.5 mM Na_2SO_4
Anschliessend wurde die Probe im Saccharose-Gradienten aufgetrennt (siehe Text 8.2.7.).

In Gegenwart von $ZnCl_2$ in RSB bilden die Membranfragmente während der Membranisolierung längliche Strukturen (Dalton 1968), die keinen Einschluss der Polypeptide in die Fragmente erlauben. Der vorangehende Versuch wurde deshalb mit 1.5 mM $ZnCl_2$ anstelle von 1.5 mM $MgCl_2$ wiederholt. Ungefähr 30% der markierten zytoplasmatischen Polypeptide konnten nach der Membranisolierung in Verbindung mit den Zellmembranen nachgewiesen werden (Abb. 42). Da $ZnCl_2$ eine vesikuläre Struktur der Membran-Fragmente verhindert, konnte durch diesen Versuch wiederum gezeigt werden, dass die zytoplasmatischen Polypeptide nicht von den Membran-Fragmenten umhüllt werden.

Die Zellmembranen wurden ebenfalls in Gegenwart von Digitonin fraktioniert. Digitonin wirkt detergentienähnlich (Merck 1968) und verursacht kleine Oeffnungen in den vesikulären Membranfragmenten. Virusinfizierte Hühner-Fibroblasten wurden deshalb während 20 Stunden mit ^3H-Fettsäuren markiert und die Zellen nach Zugabe von RSB mechanisch von der Haftfläche abgelöst. Die Zellsuspension wurde in zwei Hälften geteilt und die Zellen sedimentiert. Das eine Sediment wurde in 0.25 ml nichtmembrangebundener, ^{35}S-Met markierter Polypeptidsuspension und 0.75 ml RSB aufgenommen. Das andere Sediment wurde in 0.25 ml nichtmembrangebundener, markierter Polypeptidsuspension und 0.75 ml Puffer von hoher Salzkonzentration (0.01 M Tris pH 7.5/1.5 mM $MgCl_2$/0.4 M Na_2SO_4) suspendiert. Den beiden Proben wurde Digitonin zu einer Endkonzentration von 0.02% zugegeben. Die Zellen wurden während 30 Sekunden geschüttelt und dabei lysiert. Die Zellkerne wurden sedimentiert und das kernfreie Lysat durch einen dreistufigen Saccharose-Gradienten aufgetrennt (siehe 8.2.7.). Nach der Zentrifugation wurde der Gradient fraktioniert und die ^3H- und ^{35}S-Zählraten pro Fraktion bestimmt (Abb. 43). In Gegenwart von Digitonin und hoher Salzkonzentration wurden 11.5% ^{35}S-Met markierte Polypeptide aus der Zytoplasma-Polypeptidsuspension an die Membranen gebunden. In der Kontrolle ohne Na_2SO_4, jedoch in Gegenwart von Digitonin, hafteten 4.6% der zytoplasmatischen Polypeptide an die Membranen. Selbst in Anwesenheit von Digitonin und hoher Salzkonzentration im Zell-Lysat wurden während der Membranisolierung zytoplasmatische Polypeptide an die Membranen gebunden. Die verschiedenen Mischversuche lassen den Schluss zu, dass die zytoplasmatischen Polypeptide weder durch eine einfache Ionenbindung an die Zellmembranen binden, noch in einfacher Art in die vesikulären Membran-Fragmente eingeschlossen werden.

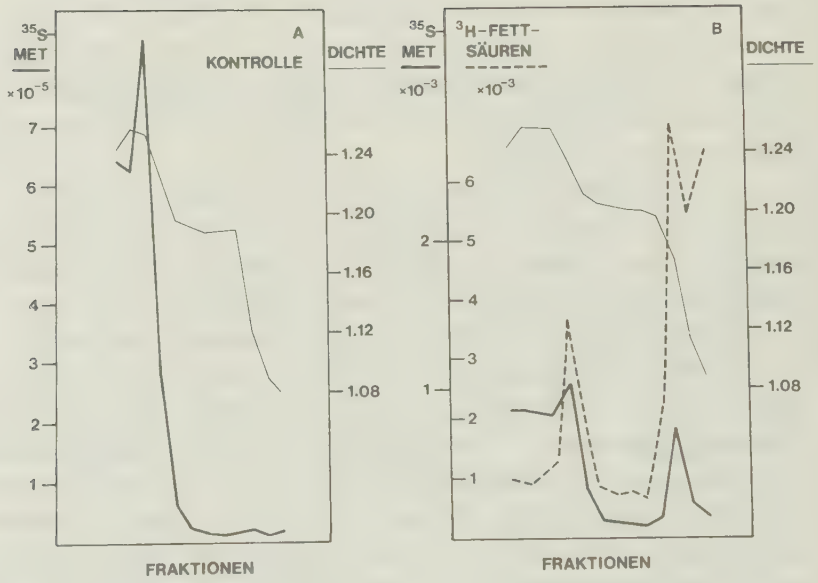


Abb. 42 : Isolierung der Zellmembranen in Gegenwart von 1.5 mM $ZnCl_2$ anstelle von $MgCl_2$.
Der hypotonische Puffer RSB, der zur Isolierung der Membranen verwendet wurde, enthielt jeweils 1.5 mM $MgCl_2$. In diesem Versuch wurde das $MgCl_2$ durch 1.5 mM $ZnCl_2$ ersetzt.

Bild A: Kontrolle: Die ^{35}S-Met markierten nichtmembrangebundenen Polypeptide wurden ein zweites Mal durch den dreistufigen Saccharose-Gradienten zentrifugiert.

Bild B: Die ^{3}H-Fettsäuren markierten Membranen wurden in Gegenwart von nichtmembrangebundenen, ^{35}S-Met markierten Polypeptiden und in Gegenwart von 1.5 mM $ZnCl_2$ anstelle von $MgCl_2$ isoliert. Ungefähr 30% der nichtmembrangebundenen Polypeptide fraktionierten mit den Membranen.

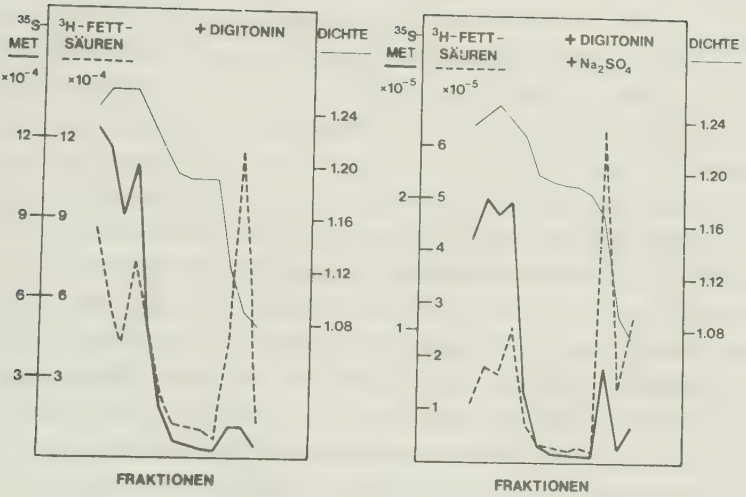


Abb. 43 : Die mit ^{3}H-Fettsäuren markierten Membranen einer Zellkultur wurden in Gegenwart von ^{35}S-Met markierten nichtmembrangebundenen Polypeptiden isoliert. Die markierten Zellen wurden mit 0.02% Digitonin lysiert. Eine zweite Probe enthielt nebst den 0.02% Digitonin 0.4 M Na_2SO_4.

In Gegenwart von Digitonin ohne Na_2SO_4 konnten 4.6% der ^{35}S-Met markierten nichtmembrangebundenen Polypeptide in der Membranfraktion nachgewiesen werden.

In Gegenwart von Digitonin und 0.4 M Na_2SO_4 wurden 11.5% der ^{35}S-Met markierten nichtmembrangebundenen Polypeptide in der Membranfraktion nachgewiesen.

12. Diskussion

In AMV-infizierten Hühner-Fibroblasten konnte eine Spaltung von viralen Vorläufer-Proteinen in vorerst kleinere Vorläufer-Proteine und schliesslich in gruppenspezifische (gs)-Strukturproteine nachgewiesen werden (Vogt und Eisenmann 1973). Um diese spezifische Spaltreaktion am viralen Vorläufer-Protein zu charakterisieren, müsste die in vivo beobachtete Proteolyse unter in vitro Bedingungen durchgeführt werden können. Um dies zu ermöglichen, wurde das virale Vorläufer-Protein aus dem Lysat von virusinfizierten Zellen gereinigt. Dies wurde mit verschiedenen physikalisch-chemischen oder immunologischen Methoden versucht.

^{35}S-Met markierte AMV-infizierte Zellen wurden homogenisiert, mit Detergentien lysiert oder ultrabeschallt. Eine Auftrennung des Zellhomogenats durch einen exponentiellen Saccharose-Gradienten oder durch Ammoniumsulfat-Präzipitation oder durch DEAE-52 Säulenchromatographie sollte einen ersten Schritt zur Reinigung der viralen Vorläufer-Polypeptide darstellen. Die viralen Polypeptide wurden jedoch über mehrere Fraktionen verteilt aufgetrennt, und diese Fraktionen enthielten zugleich den Grossteil der zellulären Polypeptide. Aus diesem Grunde erwiesen sich diese Methoden für die Isolierung der viralen Vorläufer-Polypeptide als ungeeignet.

Nach der Adsorption der viralen Antigene an spezifische Antikörper, die an BrCN-aktivierte Sepharose 4B chemisch gebunden wurden, konnte keine erfolgreiche Reinigung der viralen Polypeptide erreicht werden, da ungefähr 95% der adsorbierten, markierten Polypeptide virusunspezifisch waren. Die Immunpräzipitation der viralen Polypeptide aus dem Zell-Lysat mit Kaninchen-Antiserum gegen NP-40-lysierte AMV-Partikel war ein nützlicher, erster Reinigungsschritt, um die viralen Polypeptide von den zellulären Polypeptiden zu trennen. In den folgenden Reinigungsstufen mussten die viralen Polypeptide nurmehr von den Antikörpern und den unspezifisch präzipitierten Wirtszell-Proteinen aufgetrennt werden. Durch Sephadex - G 100 Säulenchromatographie mit verschiedenen Modifikationen konnte eine Auftrennung der dissoziierten Polypeptide nicht erreicht werden.

Nachdem in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass das Immunpräzipitat aus SDS-lysierten Zellen (0.5% SDS-Endkonzentration) qualitativ

und quantitativ dem Immunpräzipitat von NP-40/DOC-lysierten Zellen ähnlich war, wurden die viralen Polypeptide durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Die aus dem SDS-Gel eluierten viralen Vorläufer-Polypeptide waren wiederum zu 90% immunpräzipitierbar. Die bezüglich ihrer Antigenität nativen viralen Polypeptide konnten nach Immunpräzipitation aus dem Zell-Lysat und durch SDS-PAGE des Präzipitats erfolgreich gereinigt werden.

In der Absicht, die viralen Vorläufer-Polypeptide in vitro in gs-Virion-Proteine spalten zu können, wurden die gereinigten viralen Vorläufer-Polypeptide mit intakten oder aufgebrochenen AMV-Partikeln oder mit verschiedenen Virusfraktionen oder mit Lysaten von virusinfizierten oder uninfizierten Zellen inkubiert. Die Inkubationen wurden bei verschiedenen pH-Werten, bei verschiedenen $MgCl_2$-Konzentrationen und bei verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt. Bei diesen Proben konnte nach der Immunpräzipitation der viralen Polypeptide und nach Auftrennung des Präzipitats durch SDS-PAGE weder eine spezifische, noch eine unspezifische Protease-Aktivität am viralen Vorläufer-Polypeptid nachgewiesen werden. Das isolierte virale Vorläufer-Polypeptid wirkte jedoch als Enzymsubstrat für die Serin-Protease Trypsin. Für eine erfolgreiche Aktivität der spezifischen Proteasen müsste möglicherweise das virale Vorläufer-Polypeptid in einer bestimmten Konfiguration oder in Verbindung mit einer bestimmten Zellfraktion sein, um als Substrat von den Proteasen erkannt zu werden. Die virusspezifische Protease in den Zellen ist keine Serin-Protease, da in Zellkulturen die spezifische Spaltung von viralen Vorläufer-Proteinen in gs-Virion-Proteine weder mit Diisopropylfluorophosphat, noch mit Pentamidin - zwei Serin-Proteasen-Inhibitoren - gehemmt werden konnte. Andere Proteasen-Inhibitoren wie der Chymotrypsin-Inhibitor TPCK (L-1-Tosylamid-2-Phenyläthylchloromethyl Keton) oder der Trypsin-Inhibitor TLCK (Tosyl-Lysin-Chloromethyl Keton) beeinflussten die Enzymaktivität in den Zellen ebenfalls nicht (Vogt V. et al.).

Wurden die markierten Lysate von virusinfizierten Zellen nach der Ultrabeschallung inkubiert, so konnte eine Spaltung von intrazellulären viralen Vorläufer-Proteinen in gs-Virion-Proteine nachgewiesen werden. Nach der Behandlung des Lysats mit Reagenzien, die die Membranstruktur zerstören (NP-40 / Chloroform), wurde die endogene

Proteasenaktivität blockiert. Da die Zellmembranen für die spezifische Spaltung der viralen Vorläufer-Proteine verantwortlich sein könnten, wurde das virale Vorläufer-Polypeptid in Verbindung mit der Zellmembran isoliert. Die an die Membranen gebundenen Vorläufer-Proteine wurden anschliessend mit aufgebrochenen Virus-Partikeln oder mit Zell-Lysaten inkubiert. Es konnte dabei wiederum keine Protease-Aktivität am viralen Vorläufer-Protein nachgewiesen werden.

Die viralen Vorläufer-Proteine konnten sowohl als membrangebundene, als auch als zytoplasmatische Proteine aus dem Zell-Lysat isoliert werden. Ob die viralen Proteine an oder in der Zellmembran oder in einer andern Zellfraktion gespalten werden, konnte bis anhin nicht gezeigt werden. Die Bindung der viralen Vorläufer-Polypeptide an die Zellmembranen könnte einen methodischen Artefakt darstellen. Deshalb wurde die Beziehung zwischen viralen und zellulären Polypeptiden und der Zellmembran mit Hilfe von Mischversuchen studiert. Die Zellmembranen von Hühner-Fibroblasten wurden in Gegenwart von markierten zytoplasmatischen Proteinen einer andern Zellkultur isoliert. Danach konnten ungefähr 10% der markierten zytoplasmatischen Proteine in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Durch die Behandlung der Membranfraktionen mit Detergens (0.02% DOC) oder hoher Salzkonzentrationen (0.4 M Na_2SO_4) wurden die an den Membranen haftenden zytoplasmatischen Polypeptide gegenüber einer Kontrolle nicht vermehrt von den Membranen losgelöst.

Während der Fraktionierung der Zellmembranen in Gegenwart von $ZnCl_2$ anstelle von $MgCl_2$ im hypertonischen Puffer bilden sich keine vesikulären, sondern abgeflachte, längliche Membranfragmente. Gleichwohl konnten zytoplasmatische Polypeptide nach der Isolierung der Membranen in der Membranfraktion nachgewiesen werden. In einem kombinierten Versuch waren das Detergens Digitonin und 0.4 M Na_2SO_4 während der Homogenisation der Zellen und während der Fraktionierung der Zellmembranen gegenwärtig. Wiederum hafteten zytoplasmatische Polypeptide an die Membranen.

Die verschiedenen Mischversuche lassen den Schluss zu, dass die zytoplasmatischen Polypeptide nicht in die vesikulären Membran-Fragmente eingeschlossen werden, weil die zytoplasmatischen Polypeptide auch an die Membranen hafteten, wenn ihre Fragmente laminäre Strukturen

aufwiesen. Ebenfalls treten keine markierten Polypeptide aus den Membran-Vesikeln aus, nachdem die Vesikel mit Detergentien geöffnet wurden. Bei der Behandlung der zytoplasmatischen Polypeptiden beladenen Membranen mit hoher Salzkonzentration konnten die zytoplasmatischen Polypeptide nicht von den Membranen dissoziiert werden. Die zytoplasmatischen Polypeptide sind deshalb nicht durch eine einfache Ionenbindung an die Membranen gebunden. Sie könnten durch eine Kombination von chemischen Bindungen und strukturellen Anordnungen an die Membranen assoziiert werden.

13. Zusammenfassung

Hühner-Embryo-Fibroblasten, die mit Hühner-Leukose-Virus (AMV) infiziert wurden, synthetisieren ein virales Vorläufer-Protein, das in mehreren Schritten zu gruppenspezifischen Virion-Strukturproteinen gespalten wird.

Es wurde versucht, diese spezifische Spaltung in vitro zu studieren. ^{35}S-Met markierte virale Vorläufer-Proteine wurden mit Kaninchen-Antiserum gegen NP-40-lysierte AMV-Partikel aus dem Zell-Lysat immunpräzipitiert und durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese gereinigt. Die vom SDS-Gel eluierten Vorläufer-Polypeptide, die zu 90% immunpräzipitierbar waren, wurden mit AMV-infizierten oder uninfizierten Zell-Lysaten, mit gereinigten Virus-Partikeln oder mit verschiedenen Virusfraktionen unter verschiedenen Reaktionsbedingungen inkubiert. Weder eine spezifische, noch eine unspezifische Spaltung des viralen Vorläufer-Polypeptids konnte nachgewiesen werden. Das Polypeptid wurde jedoch nach Zugabe von Trypsin gänzlich verdaut. In ultrabeschallten Zell-Lysaten aus virusinfizierten Zell-Kulturen konnte eine spezifische Protease-Aktivität nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von Reagenzien, die die Membranstruktur zerstören (NP-40 / Chloroform) wurde diese endogene Protease-Aktivität blockiert. Deshalb wurde das virale Vorläufer-Polypeptid in Verbindung mit den Zell-Membranen isoliert und ebenso mit viralen oder zellulären Fraktionen inkubiert. Das virale Vorläufer-Polypeptid wurde dabei nicht gespalten. Weitere Versuche wurden durchgeführt, um die Beziehung zwischen viralen und zellulären Polypeptiden und der Zellmembran zu studieren.

Résumé

Des fibroblastes d'embryon de poulet infectés par des virus de la myoblastose aviaire (AMV) synthétisent un précurseur polypeptidique viral qui est ensuite coupé pour former les protéines structurales du virion (antigènes groupe-spécifique).

Nous avons tenté de trouver des conditions sous lesquelles ce coupage peut être étudié in vitro. Le précurseur polypeptidique marqué par la methionine-^{35}S a été isolé à partir de lysat de cellules infectées par immunoprécipitation avec un antiserum contre un lysat du virus total et purifié par électrophorèse en gel SDS-polyacrylamide. Le précurseur

polypeptidique, toujours immunoprécipitable, a été ensuite incubé avec des lysats de cellules infectées ou non infectées, avec du virus purifié ou avec différentes fractions subvirales sous différentes conditions. Ni un coupage spécifique, ni un coupage non spécifique n'a pu être détecté. Toutefois, le précurseur polypeptidique purifié est complêtement digéré par la trypsine. Dans un extrait cru de cellules infectées obtenu par sonication, un coupage spécifique du précurseur polypeptidique endogène peut se faire partiellement. Un traitement qui détruit la structure membranaire (NP-40 / chloroforme) bloque ce coupage in vitro. Nous avons isolé le précurseur polypeptidique en une forme native attachée à la membrane. Ici aussi aucun coupage n'a pu être détecté. En plus nous avons également étudié les interactions entre protéines virales et cellulaires avec la membrane cellulaire.

Summary

Chick embryo fibroblasts infected with avian myeloblastosis virus (AMV) synthesize a viral precursor-protein that is subsequently cleaved to form virion structural proteins (group specific antigens).

We have attempted to find conditions under which this cleavage can be studied in vitro. The ^{35}S-methionine-labelled precursor-protein was isolated from infected cell lysates by immunoprecipitation with an anti-serum against total disrupted AMV, and purified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The purified precursor-polypeptide, still immunoprecipitable, was incubated with AMV-infected and uninfected cell lysates, with purified virus and with different subviral fractions under different conditions. No specific nor unspecific cleavage could be detected. However the precursor-polypeptide can be completely digested by added trypsin. In crude lysates of infected cells obtained by sonication, specific cleavage of endogenous precursor-polypeptide can partially occur. Treatments that destroy membrane structure (NP-40 / chloroform) block this in vitro cleavage. We therefore isolated the precursor-polypeptide in native membrane-bound form and tried to cleave it as in the case of purified precursor-polypeptide. No cleavage of the precursor-polypeptide could be detected. In addition the interaction of cellular and viral proteins with the cellular membrane was investgated.

V. Literatur

August,J.T.,et al. (1974)
Virology 60, 595

Baltimore,D. (1970)
Nature 226, 1209

Bauer,H. (1970)
Zbl. Vet. Med. 17, 582

Bauer,H., Bolognesi,D.P. (1970)
Virology 42, 1113

Blattler,D.P.,et al. (1972)
J. Chromatography 64, 147

Bolognesi,D.P.,Bauer,H. (1970)
Virology 42, 1097

Bolognesi,D.P., Luftig,R., Shaper,J.H. (1973)
Virology 56, 549

Bonar,R.H.,et al. (1967)
Cancer Research 27, 1138

Butterworth,B.E., Rueckert,R.R. (1972)
Virology 50, 535

Chubb,R.C., Biggs,P.M. (1968)
J. Gen. Virol. 3, 87

Dalton,A.J., Haguenau,F. (1968)
The Membranes Vol.4 Acad.Press New York-London

Davis,N.L., Rueckert,R.R. (1972)
J. Virol. 10, 1010

Difco (1968)
Supplementary Literature - Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA

Duesberg,P.H., Martin,G.S., Vogt,P.K. (1970)
Virology 41, 631

Duff,R.G., Vogt,P.K. (1969)
Virology 39, 18

Dulbecco,R., Vogt,M. (1954)
J. Exp. Med. 99, 167

Eisenmann,R., Vogt,V.M., Diggelmann,H. (1974)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, (im Druck)

Fairbanks,G., Levinthal,C., Reedey,R.H. (1965)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 393

Fey,G., Hirt,B. (1974)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, (im Druck)

Fleissner, E. (1971)
J. Virol. 8, 778

Fleissner,E., Tress,E. (1973)
J. Virol. 12, 1612

Friedman,T. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci USA 71, 257

Georgopoulos,C.P.,et al. (1973)
J. Mol. Biol. 76, 45

Gesteland,R.F., Spahr,P.F. (1969)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 707

Gibson,W., Verma,I.M. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci USA 71, 4991

Hanafusa,H.,et al. (1972)
Science 177, 1188

* Huebner,R.J.,et al. (1964)
Proc. Nat. Acad. Sci USA 51, 742

Ishizaki,R., Vogt,P.K. (1966)
Virology 30, 375

Jacobson,M.F., Asso,J., Baltimore,D. (1970)
J. Mol. Biol. 49, 657

Korant,B.D., Kauer,J.C., Butterworth,E.E. (1974)
Nature 248, 588

Krantz,N.J., Lee,Y.C., Hung,P.P. (1974)
Nature 248, 648

Kreibich,G., Sabatini,D. (1973)
Federation Proceedings 32, 2133

Laemmli,U.K. (1970)
Nature 227, 680

Linial,M., Mason,W.S. (1973)
Virology 53, 258

Merck Index, The (1968)
An Encyclopedia of Chemicals and Drogs, 8th ed.

Niall,H.D. (1970)
Proc. Nat. Acad. Sci USA 67, 184

Perdue,J.F., Kletzien,R., Miller,K. (1971)
Biochem. Biophys. Acta 249, 419

Perlmann,G.E., Lorand,L. (1970)
Methods in Enzymology - Proteolytic Enzymes XIX. Vol.
Acad.Press New York-London

Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala
BrCN-activated Sepharose 4B for Immobilisation of Biopolymers

Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala
Sephadex - Gel Filtration in Theory and Practice

Prouty,W.F., Goldberg,A.L. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3341

Quigley,J.P., Rifkin,D.B., Compans,R.W. (1972)
Virology 50, 65

* Herman,A.C., Green,R.W.,Bolognesi,D.P.,Vanaman,T.C. (1975)
Virology 64, 339

Reid,M.S., Bieleski,R.L. (1968)
Anal. Biochem. 22, 374

Rifkin,D.B., Compans,R.W. (1971)
Virology 46, 485

Scheele,C.M., Pfefferkorn,E.R. (1970)
J. Virol. 5, 329

Schlessinger,S., Schlessinger,M.J. (1972)
J. Virol. 10, 925

Temin,H.M., Mizutani,S. (1970)
Nature 226, 1211

Tooze,J. (1973)
The Molecular Biology of Tumor Viruses
Cold Spring Harbor Press, New York

Verma,I.M., Baltimore,D. (1973)
Methods in Enzymology, eds. Grossman,L. Moldave,K. XXIX. Vol. p.125
Acad.Press, New York-London

Verma,I.M., Mason,W.S., Drost,S.D., Baltimore,D. (1974)
Nature 251, 27

Vogt,P.K. (1969)
In Comparativ Leukemia Research, eds. Dutcher,R.M. p.153

Vogt,V.M., Eisenmann,R. (1973)
Proc. Nat. Acad. Sci USA 70, 1734

Vogt,V.M., Eisenmann,R., Diggelmann,H.
J. Mol. Biol. (im Druck)

Weber,K., Osborn,M. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4406

Williams,C.A., Chase,M.W. (1968)
Methods in Immunology and Immunochemistry II. Vol.
Acad.Press New York-London